Biochemische und feinstrukturelle Untersuchungen zum Nachweis und zum Bau der Zellwandproteine von Polyphysa (Acetabularia) cliftonii und ihre Beziehungen zum Zellwandwachstum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lüder Göke
aus Nordenham

Berlin 1978

Biochemische und feinstrukturelle Untersuchungen zum Nachweis und zum Bau der Zellwandproteine von Polyphysa (Acetabularia) cliftonii und ihre Beziehungen zum Zellwandwachstum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lüder Göke
aus Nordenham

Berlin 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. G. Werz

2. Referent: Prof. Dr. H. Clauss

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.78

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 8

1. Pflanzenmaterial 8

a. Kulturmethoden 8

b. Hemmstoffbehandlung 8

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen 8

3. Präparationen für die elektronenmikroskopische Untersuchung 9

a. Fixierung, Entwässerung, Einbettung 9

b. Kontrastierung 9

c. Gefrierätzung 9

4. Elektronenmikroskopische Untersuchung 9

5. Chemische Untersuchungen 10

a. Isolierung und Reinigung der Zellwand 10

b. Hydrolyse der Zellwand 10

c. Stickstoffbestimmung 10

d. Hexosebestimmung 10

e. Aminosäurebestimmung 10

f. Phosphorbestimmung 10

g. Dünnschichtchromatographie 10

6. Lösen der Zellwand in Ameisensäure und in $ZnCl_2$-Lösung 10

7. Spaltung der Zellwandproteine mit Bromcyan 11

8. Gelelektrophorese 12

9. Spektroskopie 13

10. Röntgenstrukturuntersuchungen 13

III. Ergebnisse 15

1. Struktur der Zellwand unter Berücksichtigung des Zellwandproteins 15

1.1. Struktur der Zellwand 15

1.2. Nachweis, strukturelle und funktionelle Aspekte des Zellwandproteins 21

1.2.1. Lichtmikroskopischer Nachweis 21

1.2.2. Elektronenmikroskopischer Nachweis 22

1.2.3. Funktionelle Aspekte 25

1.2.3.1. Feinstruktur der Zellwände gehemmter Zellen 29

2. Chemie der Zellwand 34

2.1. Zellwandpolysaccharide 34

2.2. Zellwandprotein 35

2.3. Andere Zellwandbestandteile 36

3. Durch Lösungsmittel modifizierte Zellwand und ihr Protein 37

3.1. Behandlung der Zellwand mit $ZnCl_2$-Lösung 40

3.1.1. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Mannanpräzipitats (MPR) 43

3.2. Behandlung der Zellwand mit Ameisensäure 46

3.2.a. Stabilität und andere Eigenschaften der gelösten Zellwandkomponenten nach langer Inkubation in Ameisensäure 48

3.2.1. Aggregation von Zellwandkomponenten 49

3.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Zellwandfilms (ZWF) 51

4. Röntgenographische Untersuchungen der Zellwand und der Zellwandkomponenten im Hinblick auf ihr Protein 54

5. Charakterisierung des isolierten Zellwandproteins 58

5.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Zellwandproteinen und ihren Bromcyanpeptiden 58

5.2. Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung des isolierten Zellwandproteins (ZWK 1) 60

IV. Diskussion 65

1. Zur Problemstellung und Methodik 65

2. Chemische Aspekte des Zellwandproteins und seiner Integration in die Zellwand 67

3. Strukturelle Aspekte des Zellwandproteins 70

4. Zu den Zellwandkomponenten 75

5. Zur Aggregation von Zellwandkomponenten 76

6. Zum isolierten Zellwandprotein 78

7. Modellvorstellungen zur Protein-Polysaccharid-Interaktion bei der Zellwandbildung 79

V. Zusammenfassung 83

VI. Publikationen 84

VII. Literatur 86

Danksagung

Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544713_0004

I. EINLEITUNG

Die meisten pflanzlichen Zellen bauen während ihrer Entwicklung eine komplexe Zellstruktur, die Zellwand, auf (Übersichten bei: Küster, 1956; Frey-Wyssling, 1976). Sie ist in der Regel schichtig organisiert. Ihre Schichten sind im typischen Fall vorwiegend aus Poly- und Oligosacchariden aufgebaut. Ein Teil der Polysaccharide ist hochpolymer - z.B. Zellulose, ß-1.4-Mannane - und ihre Moleküle sind zu Elementar- und diese sind zu Mikro- und Makrofibrillen assoziiert. Die Strukturpolysaccharide sind in eine Matrix von z.T. stark verzweigten Poly- und Oligosacchariden eingebettet. Struktur- und Enzymproteine stehen zu ihnen in enger Beziehung (Lamport, 1965; Preston, 1974).

Der chemischen Komplexität entspricht die Funktionenvielfalt der Zellwand (s. auch: Frey-Wyssling, 1976). Hier ist besonders ihre zellstabilisierende Funktion zu nennen, die stets unabhängig von der jeweiligen Zellform gewährleistet sein muß. Die komplexe Bau- und Funktionsweise der Zellwand steht daher in enger Beziehung zur Ausbildung der (art-)spezifischen Zellform: Ändert sich während der Morphogenese die Zellform, so ändert sich auch die Zellwand. Ihre äußere Form und ihre innere Struktur, z.B. das Fibrillenmuster, und z.T. auch ihre chemische Zusammensetzung werden durch genetisch determinierte Bildung und/oder Abbau von Zellwand spezifisch gestaltet. Diese Prozesse können einzeln oder zusammen, über die gesamte Zellwand (z.B. Flächenwachstum (Roelofsen, 1953)) oder an definierten Stellen der Zellwand wirken (z.B. Spitzenwachstum (Green, 1969), Bildung von Wirteln und Hutkammern bei Aceta-

bularia (Werz, 1965, 1970 a, b, 1974). An Bildung und Abbau sind jeweils viele zeitlich und räumlich koordinierte Einzelprozesse beteiligt (Werz, 1957, 1965, 1974). Nur einige von ihnen sind genauer bekannt (Übersichten bei: Loewus, 1973; Villanueva et al., 1973; Preston, 1974). Von ihnen ausgehend werden im folgenden Probleme der (art-) spezifischen Zellwandbildung und Ansätze zu Lösungsmöglichkeiten dargestellt.

Zellwandbildung, d.h. Wachstum und Differenzierung der Zellwand sind primär mit den submikroskopisch faßbaren Veränderungen in der Struktur und Orientierung der fibrillären Strukturpolysaccharide zu korrelieren (Roelofsen, 1953). Die Matrixsubstanzen, die dabei ebenfalls erheblich verändert werden dürften, sind mangels geeigneter Darstellungsmethoden morphologisch weniger gut faßbar (z.B.: Leppard u. Colvin, 1971; Freundlich u. Robards, 1974). Die Mechanismen, die zur Strukturbildung und Orientierung der fibrillären Polysaccharide führen, sind daher auch grundlegend für das Verständnis der Formbildung.

Für die Zellulose - das in bezug auf die molekulare und fibrilläre Organisation am besten untersuchte pflanzliche Strukturpolysaccharid - wurde vermutet, daß Dictyosomen für ihre Synthese und ihren Transport verantwortlich sind (Drawert u. Mix, 1961/2; s.auch: Kiermayer, 1977). Dafür sprechen u.a. auch die feinen fibrillären Strukturen, die bei verschiedenen Pflanzen in bestimmten Dictyosomenvesikeln vorkommen (z.B.: Gabara, 1975). Der Nachweis, daß es sich dabei um Zellulose handelt, steht jedoch aus (s. aber: Gabara, 1975).

Die in Dictyosomenvesikeln gefundene "ß-1.4-Glucansynthetaseaktivität" konnte bislang nur mit der Bildung nichtzellulosischer Glucane der Matrix in Verbindung gebracht werden (Ray et al., 1976; Robinson et al., 1976; Wright u. Northcote, 1976). Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß Dictyosomen Zellulose oder zellulose-ähnliche Glucane synthetisieren und auch in den Transport von Zellulosevorstufen eingeschaltet sein können (Gabara, 1975; Shore et al. 1975). Die Befunde an Petunia-Pollenschläuchen (Engels, 1974) sowie an Pleurochrysis (Herth et al., 1972) könnten dafür Hinweise sein.

Für die Zellulosesynthese am Plasmalemma, wie sie seit langem von Preston (1964) postuliert wird, stehen zahlreiche, vorwiegend feinstrukturelle Befunde. Sie beziehen sich auf das Vorkommen von orientierten Plasmalemmastrukturen, die erste Zeichen eines Beginns der Fibrillenbildung und -orientierung sein sollen (Preston,1964; Robinson u. Preston, 1972; Roland, 1973; Heath, 1974) sowie auf das in der Regel erste sichtbare Auftreten von fibrillären Komponenten im Plasmalemmabereich (Shore et al., 1975; Brown u. Montezinos, 1976; Willison, 1976; Robenek u. Peveling, 1977). "ß-1.4-Glucansynthetaseaktivität" konnte am Plasmalemma jedoch noch nicht festgestellt werden (Shore et al., 1975; Chrispeels, 1976). Daß Zellulosesynthese in enger Beziehung zur (Zytoplasma-)Membran verläuft, zeigen auch die neueren Untersuchungen an Acetobacter xylinum (Brown et al., 1976) sowie die Untersuchungen von Robenek u. Peveling (1977) an Protoplasten von Skimnia japonica.

Von großer Bedeutung für die Entstehung der spezifischen

Zellwandstruktur sind auch diejenigen Prozesse, die sich "außerhalb" des Plasmalemmas vollziehen. So zeigen z.B. in Suspensionskultur gehaltene Protoplasten einiger höherer und niederer Pflanzen nur eine mäßige oder geringe Zellwandbildung. Es konnte festgestellt werden, daß erhebliche Anteile von Matrixsubstanzen mit dem Kulturmedium ausgewaschen werden. Zusatz von Gelatine oder Polyäthylenglycol verbessert die Fibrillen- bzw. Zellwandbildung, vermutlich, indem ein matrixähnliches Milieu geschaffen wird (Něcas, 1961; Kameya, 1973). Untersuchungen an pflanzlichen (Něcas et al., 1968) und an tierischen Zellen (Kochhar et al., 1976) zeigen, daß zwar nicht für die Entstehung wohl aber für die ordnungsgemäße Orientierung und den Feinbau von Polysaccharid- und Kollagenfibrillen eine Matrix notwendig ist. Die enzymatischen Reaktionen werden hier offensichtlich durch spezifische physikochemische Wechselwirkungen zwischen den Molekülen unterstützt. Diese Wechselwirkungen können nur über den molekularen Bau der Zellwandkomponenten kontrolliert werden.

Zellwandkomponenten, die u.a. auf diese Weise wirksam Strukturspezifität vermitteln könnten, sind die - im Gegensatz zu den extrahierbaren Enzymproteinen - kovalent an die Polysaccharide gebundenen Strukturproteine (Lamport, 1965, 1970). Ihr molekularer Bau ist genetisch determiniert und bestimmt ihren Polyelektrolytcharakter. Dadurch ist die Art der Wechselwirkung mit den umgebenden Molekülen unter den jeweiligen pH-, Ionen- und Hydratationsverhältnissen vorgegeben. Auch eine ionotrope Ausrichtung von Proteinen könnte möglich sein (Thiele, 1967). Eine weitere Art der Strukturvermittlung wäre denkbar, wenn Zellwandpolysaccharide ähn-

lich wie z.B. Glycogen (s.auch: Whelan, 1976), Hefe-Mannane (Ballou, 1974; Sentandreu u. Elorza, 1973) an einem spezifischen Proteingerüst synthetisiert würden (s. auch: Werz, 1967, ferner: Roland u. Vian, 1971).

Die bisherigen Ergebnisse (Übersichten bei: Lamport, 1965, 1970) lassen - auch im obigen Sinne - auf eine zentrale Funktion der Zellwandstrukturproteine schließen: Alle untersuchten Zellwände enthalten Strukturproteine. Zellwände verschiedener Pflanzen, Zellen und Zellstrukturen (z.B. bei Polyphysa (Acetabularia) cliftonii (Göke et al., 1974)) zeigen (art-)spezifische Aminosäurekompositionen.
Bei höheren Pflanzen wurden zwischen Zellwandwachstum und dem Verhalten des hydroxyprolinreichen Zellwandproteins Extensin enge Beziehungen gefunden (Lamport, 1965, 1967, 1970; Jotterand-Dolivo u. Pilet, 1976).
Bei einigen Grünalgen (z.B. Chlamydomonas) besteht die Zellwand vorwiegend aus einem Strukturprotein mit einem relativ geringen Kohlenhydratanteil (Roberts, 1974). Die Untereinheiten des Proteins besitzen die Eigenschaft zu aggregieren (Self-assembly (Bouck u. Brown, 1976)) und rekonstituieren so die Zellwand (Hills, 1973).
Die Eigenschaft, zu aggregieren, könnte auch für Zellwandproteine und die Zellwandbildung bei höheren Pflanzen von Bedeutung sein.
Die Bedeutung der Zellwandstrukturproteine für den Bau der pflanzlichen Zellwand zeigen auch die Befunde an Zellwänden von Acer-Protoplasten, die Lamport (1970) und Albersheim et al. (1973) - mit Blick auf Bakterienzellwände - veranlaßten,

die strukturelle Komponente der Acer-Zellwand als "large bagshaped molecule" (zum Begriff: Weidel u. Pelzer, 1964) zu beschreiben.

Die Befunde über Zellwandproteine und Zellwandbildung zeigen jedoch, daß man noch weit davon entfernt ist zu verstehen, wie zahlreiche Prozesse und die durch sie zueinander in Beziehung gesetzten Zellwandvorstufen zeitlich-räumlich koordiniert zusammenwirken und (art-)spezifische Zellwand bilden.

Einige Gründe dafür sollen genannt werden: Der chemische Aufbau, die physikochemischen Eigenschaften von Zellwandvorstufen und ihr Einfluß auf die Strukturbildung sind nur in begrenztem Umfang bekannt. Dies ist z.T. durch experimentelle Schwierigkeiten bedingt, Zellwandvorstufen bzw. Zellwandbestandteile chemisch und morphologisch detailliert zu erfassen. So sind auch bei besser untersuchten Zellwandproteinen nicht alle Arten der Interaktion mit anderen Zellwandbestandteilen bekannt. Es ist auch noch nicht nachgewiesen, daß Zellwandproteine die Strukturbildung der Polysaccharidanteile "dirigieren", obwohl, wie dargestellt wurde, einige Hinweise dafür sprechen.

Aus diesen Gründen sind weitere Untersuchungen an Zellwandproteinen u. a. an Organismen mit experimentell gut zugänglichen (art-)spezifischen Zellwandbildungen erforderlich. Die Untersuchungen müssen u.a. neben der chemischen auch die morphologische Charakterisierung von Zellwandproteinen und ihrer Interaktionen mit anderen Zellwandbestandteilen (insbesondere den Zellwandpolysacchariden) zum Ziel haben. Eigenschaften isolierter Zellwandproteine können dann besser

für die Erklärung der Proteinfunktionen in der Zellwand herangezogen werden.

Für die Untersuchung der Beziehungen zwischen Zellwandproteinen und der Zellwand- bzw. der Zellmorphogenese dürfte die einzellige, marine Grünalge Polyphysa (Acetabularia) cliftonii geeignet sein. Sie bildet im Laufe ihrer Entwicklung experimentell gut faßbare artspezifische Zellstrukturen, z.B. die ± zylindrische, vegetative Zelle ("Stiel") und zum Abschluß der vegetativen Phase apikal den Gametangienständer ("Hut"). Beide Zellstrukturen besitzen artspezifische Zellwände, die sich u.a. in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden (Tab. 2; Abb. 13).

Erste Untersuchungen zum Nachweis des Zellwandproteins, zu seiner strukturellen und chemischen Interaktion mit anderen Zellwandbestandteilen wurden an Stielzellwänden und sie konstituierenden Komponenten durchgeführt.
An isolierten Stielzellwandproteinen wurden einige ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften untersucht.
(Befunde über die Zusammensetzung von Hutzellwänden wurden nur mitgeteilt, um die in der Einleitung besprochenen Unterschiede zu dokumentieren.)

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial

a. Kulturmethoden

Für die Untersuchungen wurde die Dasycladacee Polyphysa (Acetabularia) cliftonii verwendet. Die Zellen waren in Erd-Schreiber-Lösung bei 10 Stunden Licht (2400 Lux) im Wechsel mit 14 Stunden Dunkelheit und bei 21° C angezogen worden (Hämmerling, 1944).

b. Hemmstoffbehandlung

Die Zellen wurden in einer Schreiber-Lösung, die 0.05 mM 2.2'-Dipyridyl enthielt (Göke, 1972), verschieden lange kultiviert. In einigen Fällen wurden die Zellen in Schreiber-Lösung zunächst auf 1 cm Länge zurückgeschnitten und erst nach Festigung des Wundverschlusses in die hemmstoffhaltige Lösung übertragen. Als Kontrollzellen dienten in jedem Falle Zellen aus Schreiber-Lösung ohne Hemmstoffzusatz.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Es wurden phasenkontrast-, fluoreszenz-, polarisations- und durchlichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für einen Teil der durchlichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen in einer Lösung von 0.25 % Coomassie Blue (SERVA) in 50 %igem Äthanol mit 10 % Zusatz konzentrierter Essigsäure gefärbt und anschließend unter mikroskopischer Kontrolle in 5 %igem Äthanol mit 7.5 % Zusatz konzentrierter Essigsäure differenziert.

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen in einer 0.1 %igen Lösung von 1-Anilinonaphthalin-8-sulfon-

säure-Mg-Salz (=ANS) (SERVA) in 0.2 M $KHCO_3$ inkubiert und nach 4 bzw. 20 Minuten untersucht.

3. Präparationen für die elektronenmikroskopische Untersuchung

a. Fixierung, Entwässerung, Einbettung

Zellen wurden in einer Lösung von 0.3 M Glutaraldehyd in 0.1 M Na-Kakodylatpuffer, pH = 7.4, mit 0.25 M Saccharose, 1 Stunde bei + 4° C fixiert und in 1 % OsO_4 in 0.1 M Na-Kakodylatpuffer, pH = 7.4, 1 Stunde nachfixiert. Auswaschen und Entwässern erfolgten wie üblich. Die Zellen wurden in ERL nach Spurr (1969) eingebettet. Schnitte wurden auf kohle- und formvarbefilmte Netze aufgebracht.

b. Kontrastierung

Für normale Untersuchungen erfolgte die Kontrastierung der Schnitte mit methanolischem Uranylazetat und mit Bleizitrat+) nach Reynolds (1963).- Zum Nachweis von Polysacchariden bzw. Proteinen wurden die Schnitte mit Phosphorwolframsäure, pH = 2 10 Min.,bzw. pH = 8 (mit 1 N NaOH eingestellt) 30 Min. kontrastiert und nur kurz mit aq. dest. gespült. - Die Negativkontrastierung erfolgte 2-5 Min. mit 2 % Phosphorwolframsäure, pH = 7.3. - Die Kontrastierung mit Rutheniumrot erfolgte nach Luft (1966) (s. Geyer, 1973).

c. Gefrierätzung

Gefrierätzung von Zellen erfolgte nach Zerban et al. (1973). Gefrierätzung von Zellwandfilmen und Mannanpräzipitaten erfolgte unmittelbar nach kurzfristiger Imbibierung der Objekte in 30 %igem Glycerin.

4. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Sie erfolgte am JEM T 8 (JEOL) und am ELMISKOP 101 (SIEMENS). Für die Dokumentation wurden Scientia Planfilme 23 D 56 und

+) kurz: methanolisches Uranylazetat

Platten 23 D 50 (AGFA GEVAERT) verwendet.

5. Chemische Untersuchungen

a. Isolierung und Reinigung der Zellwand: nach Göke et al., (1974), s. auch: Göke (1972).

b. Hydrolyse der Zellwand

Für die Aminosäure- bzw. Zuckerbestimmung wurde die Zellwand 18 Stunden in 6 N HCl bei 110° C bzw. 2 Stunden in 2 N HCl bei 110° C in abgeschmolzenen Ampullen hydrolysiert.

c. Stickstoffbestimmung: nach Cleghorn u. Jendrassik (1934).

d. Hexosebestimmung: nach Dubois et al. (1956).

e. Aminosäurebestimmung: nach Moore u. Stein (1957) und nach Spackman et al. (1958).

f. Phosphorbestimmung: nach Chen et al. (1956).

g. Dünnschichtchromatographie

Für Aminosäuren: Laufmittel für die erste Richtung: n-Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:1; für die zweite Richtung: Phenol + Wasser = 75 + 25. - Nachweis mit Ninhydrinreagenz.

Für Zucker: Laufmittel: Essigsäure:Pyridin:Wasser = 6:4:1. Nachweis mit Anilinphthalat.

Für die Trennung wurden in beiden Fällen Zellulose-Dünnschichtplatten (Schichtdicke 0.1 mm) (MERCK) verwendet.

6. Lösen der Zellwand in Ameisensäure und in $ZnCl_2$-Lösung

Das Lösen der gereinigten Zellwand in konzentrierter Ameisensäure wurde verschieden lange bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (s.Abschnitt III/3.2.). Die resultierenden Zellwand-Ameisensäure-Lösungen (Konzentration in der Regel 1 - 2 mg / ml) wurden für spektroskopische Untersuchungen direkt

verwendet. Für die Darstellung von Zellwandfilmen (Tab. 3) wurden bei Raumtemperatur hergestellte Zellwand-Ameisensäure-Lösungen im Vakuum zur Trockene eingeengt. Die Zellwandfilme wurden anschließend nach Zusatz von aq. dest. von der Gefäßwand abgelöst (zur Stabilität der Filme, s. Abschnitt III/3.2.) und waren damit für Untersuchungen verwendbar.

Das Lösen der Zellwand in 50 %iger $ZnCl_2$-Lösung (Miwa et al., 1961) wurde ebenfalls verschieden lange bei verschiedenen Temperaturen (Abschnitt III/3.1.) durchgeführt. Zur Gewinnung des Mannanpräzipitats (MPR; Tab. 3) wurde die Zellwand 4 - 5 Stunden bei 70° C in 50 %iger $ZnCl_2$-Lösung inkubiert. Aus dieser Zellwand-$ZnCl_2$-Lösung wurde MPR mit Aceton präzipitiert (Miwa et al., 1961),und anschließend wurde das MPR mit kalter 1 N HCl und danach mit aq. dest. gewaschen.

Zur Gewinnung der filmartigen Komponente ZWF 1 (Tab. 3) wurde das MPR ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur in konzentrierter Ameisensäure gelöst und die Lösung anschließend im Vakuum zur Trockene eingeengt. Die filmartige Komponente konnte ebenfalls nach Zusatz von aq. dest. von der Gefäßwand abgelöst werden. Die dabei zugleich entstandene weißliche Komponente konnte mechanisch vom Film getrennt werden.

7. Spaltung der Zellwandproteine mit Bromcyan

Dazu wurden 0.7 ml einer bei Raumtemperatur hergestellten Zellwand-Ameisensäure-Lösung (0.5 - 1 mg Zellwand/ml konz. Ameisensäure) mit 0.3 ml aq. dest., 12 mg Bromcyan und mit Mercaptoäthanol (100 mM) versetzt und 20 Stunden bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubiert. Die Spaltung wurde durch

Zusatz von aq. dest. gestoppt. Das Spaltungsgemisch wurde im Vakuum eingeengt. Aliquote Teile des Spaltungsgemisches wurden für die Gelelektrophorese verwendet.
Zur Spaltung von Proteinen mit Bromcyan s. auch: Gross (1967).

8. Gelelektrophorese

Es wurden SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgele mit Acrylamidkonzentrationen von 7 - 14.5 % verwendet. Die Gele wurden aus Acrylamid-Harnstoff-Lösung (12 g Harnstoff, 3.62 g Acrylamid, 0.14 g N,N'-Methylenbisacrylamid, 5 ml Puffer (pH = 7), ad 25 ml aq. dest.) durch entsprechendes Verdünnen mit Puffer (34.9 g Tris, 10.2 ml H_3PO_4, 1.5 g SDS ad 300 ml mit aq. dest.) (pH = 7) hergestellt. Pro Verdünnung (gesamt 5.8 ml) wurden 10 µl Temed und 0.2 ml 0.6 % iges Ammoniumpersulfat hinzugegeben. Der Elektrolytpuffer wurde aus dem o.g. Puffer durch Verdünnen mit aq. dest (1:4) hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte 18 Stunden bei 1 mA/Röhrchen. (Vorschrift für die Elektrophorese nach Paradies, unveröff.)
Die Kalibrierung erfolgte mit Standardproteinen (BOEHRINGER). Färben und Entfärben der Gele erfolgte nach Shapiro et al. (1967). Die Molekulargewichte wurden nach dem bei Hedrick u. Smith (1968) angegebenen Verfahren ermittelt.

Anm.: Die Trennung der Proteine, die aus Zellwand-Ameisensäure-Lösungen bzw. aus den Spaltungsgemischen stammen, verlief nicht immer zufriedenstellend. Das wird auf die vermutlich zu hohen Kohlehydratanteile zurückgeführt.
Die im ersten Fall erhaltenen Molekulargewichte entsprechen etwa denen, die für das isolierte, gereinigte Protein (< 0.1 % Kohlehydrat) mit Gelelektrophorese n. Shapiro gefunden wurden (s. Paradies et al., 1977 a).

9. Spektroskopie

Messungen im sichtbaren und im ultravioletten Licht wurden mit einem BECKMANN-Spektralphotometer DB-GT unter Verwendung von Quarz-Küvetten, d = 1 cm, durchgeführt.[1]

Streuungsmessungen zur Ermittlung der Partikelgrößen in Lösungen erfolgten nach Jirginsons u. Straumanis (1954), Reddi (1957). Aus der Streulichtextinktion K_λ und der Potenz λ^{-n} wurde bei verschiedenen Wellenlängen (λ von 350 - 550 nm) für verschiedene n = -2, -3, -4 nach $K \cdot \lambda^{-n} = C$ die Streulichtkonstante C errechnet. Liegt die Partikelgröße in der Lösung vorwiegend bei 50 nm so ergibt sich für n = - 4 ein konstantes Produkt C in Abhängigkeit von λ. Entsprechend konstante Produkte C ergeben sich für n = -3, -2, wenn die Partikelgrößen vorwiegend bei 120 nm bzw. bei 250 nm liegen.
Für die Ermittlung des wahrscheinlichen Teilchengrößenbereichs wurden für jede untersuchte Probe die Variationskoeffizienten (%) zu den Mittelwerten $\bar{C}$ errechnet. Der kleinste Variationskoeffizient kennzeichnete den wahrscheinlichen Teilchengrößenbereich.

IR-Spektroskopie und Messung des Circulardichroismus erfolgten wie bei Paradies et al. (1977 a) beschrieben.

10. Röntgenstrukturuntersuchungen

Aus Lösungen von Zellwand in 60 % Ameisensäure wurden Zellwandproteine durch Präzipitation mit Hexafluorisopropanol gewonnen. Danach wurden die Proteine in einem Exsikkator bei 70 - 75 % relativer Feuchte bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Proteinproben wurden für die Untersuchung in Glaskapil-

1) zur Interpretation von UV-Spektren: Wetlaufer, 1962

laren oder Plastikkammern (mit Mylar-Fenstern) überführt. Die röntgenographische Untersuchung der Proben erfolgte mittels einer Toroidspiegel-Kamera (SEARLE; U.K.) und mit einer Debye-Scherrer-Kamera mit Ni-gefilterter CuK_{α} -Strahlung. Sie wurde mit einer Mikrofokus-Röhre (AEG) in Verbindung mit einem MÜLLER-SEIFFERT-Röntgengenerator bei 40 kV und 25 mA erzeugt (s. auch: Paradies et al., 1977 a).

Die röntgenographischen Untersuchungen der Zellwände, der isolierten Zellwandkomponenten und des Zellwandfilms wurden ebenfalls mit einer Toroidspiegel-Kamera und mit Ni-gefilterter CuK_{α} -Strahlung durchgeführt (weitere Daten wie oben). Die Proben wurden für die Untersuchungen zwischen Klammern oder auf bzw. in Glaskapillaren in den Strahlengang eingebracht.

Die Beugungsaufnahmen wurden z.T. densitometrisch mit einem JOYCE-LOEBL-Mikrodensitometer ausgewertet.

Zur Technik der Röntgenstrukturuntersuchung und Auswertung von Beugungsaufnahmen s. auch: Henry et al. (1961), Fraser u. McRae (1973), Krischner (1974) und Sherwood (1976).

Anm.: Einige Beugungsaufnahmen wurden hier nicht wiedergegeben, da sie sich nur schwer photographisch reproduzieren ließen. Es wurden daher nur die d-Werte angegeben (Tab. 4).

III. ERGEBNISSE

1. Struktur der Zellwand unter Berücksichtigung des Zellwandproteins

1.1. Struktur der Zellwand

Polyphysa (Acetabularia) cliftonii wächst vornehmlich unipolar an der Zellspitze. Das Zellwandwachstum erfolgt dabei auf eine im Detail noch nicht bekannte Art der Eingliederung von Zellwandvorstufen in die Zellwand, vornehmlich im Bereich der Zellspitze (Werz, 1957; Hämmerling u. Werz, 1958).
Die Zellwand kann lichtmikroskopisch in etwa drei "Hauptschichten" gegliedert werden. Letztere zeigen im phasenkontrastmikroskopischen Bild weitere Schichtungen (Abb. 1 a, b). Die Schichtung der Zellwand wird von der Spitze der Zelle nach basal ausgeprägter. Die Zellwand kann im Mittel ungefähr 10 µ dick werden.

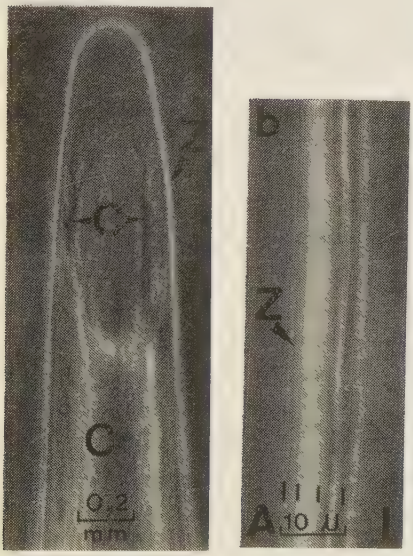


Abb. 1 a, b
Schichtung der Zellwand.
a: Zellspitze; Cytoplasma (C) durch Präparation bedingt leicht kontrahiert; Cytoplasmastränge führen zur Zellwand (Z). b: Zellwand aus dem basalen Teil einer Zelle mit ausgeprägten Schichtungen; ungefähre Lage der "Hauptschichten" durch senkrechte Striche angedeutet. - Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen; a: 50 x, b: 1260 x. I: innen, A: außen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung an positivkontrastierten Dünnschnitten der Zellwand zeigt ebenfalls in günstigen Fällen den Schichtenbau (Abb. 2 a-c). Auf eine äußere dünne, etwa dreifach untergliederte Schicht folgen zur Zellwandinnenseite hin drei dickere "Hauptschichten". Sie setzen sich aus feineren, parallel zur Zellängsachse verlaufenden Einzelschichten zusammen, deren fibrilläre Strukturelemente sich bäumchenartig verzweigen (Abb. 2 c) und die parallele und ± transversale Textur der Zellwand ergeben (Abb. 2 a; Abb. 4 a, b). Die Packungsdichte der Fibrillen nimmt zur Zellwandinnenseite hin ab (Abb. 2 a-c). Neben den fibrillären Strukturelementen treten unabhängig von der Schnittrichtung Strukturen auf, die - im Vergleich zu ersteren - durch eine etwas stärkere Kontrastierbarkeit ausgezeichnet sind (s. auch: Abb. 6 a, c). Es könnte sich demnach um distinkte Strukturen handeln. Da sie in enger struktureller Beziehung zu den fibrillären Strukturelementen auftreten,ist ihre Morphologie schwer zu erschließen. Aufgrund der vorliegenden Befunde könnten diese Strukturen konzentrisch aufgebaut sein (Ø etwa 5 - 10(20) nm) und über "speichenartige" Fortsätze mit den fibrillären Strukturelementen in Beziehung stehen. Sie sollen hier vorläufig als "konzentrische Strukturelemente" bezeichnet werden.

Der relativ regelmäßige Zellwandbau wird stellenweise durch an- bzw. eingelagerte, 1 - 2 µm (Ø) große, aus Zellwandmaterial bestehende, konzentrische Einschlußkörper unterbrochen. Die Packungsdichte des Zellwandmaterials ist im Inneren dieser Körper höher als in ihren äußeren Bereichen (Abb. 3).

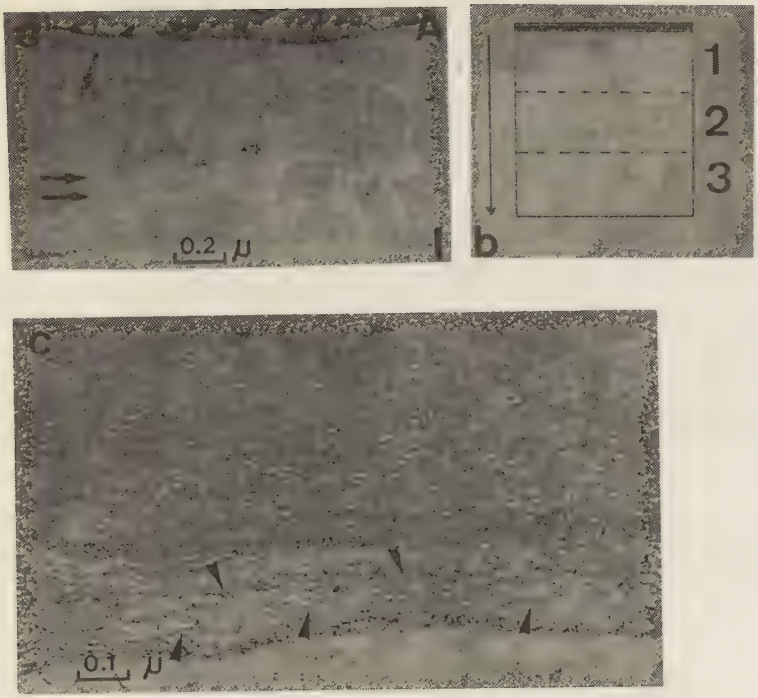


Abb. 2 a-c

Längsschnitte durch die Zellwand in der Nähe der Zellspitze (a, c) und Schema des Schichtenbaues der Zellwand (b).
a: Schichtenbau der Zellwand sowie transversale (↓) und parallele (⇉) Zellwandtextur. Eine Verringerung der Packungsdichte der fibrillären Strukturelemente in der Zellwand von außen (A) nach innen (I) ist zu sehen. b: Schema zu (a). Der Pfeil kennzeichnet die Abnahme der Packungsdichte. Zellwandschichten: Auf eine dünne, etwa dreifach gegliederte äußere Schicht folgen drei dickere "Hauptschichten".
c: Innere Zellwandschichten mit bäumchenartigen Strukturen (►)
Vergrößerungen: a) 45000 x, (c) 90000 x. Kontrastierungen: (a, c) Methanolisches Uranylazetat.

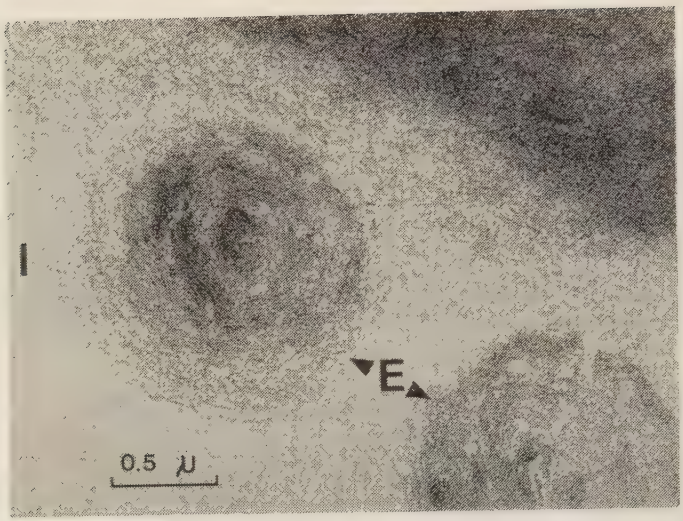


Abb. 3
Zellwand mit Einschlußkörpern (E). Kontrastierung: Methanolisches Uranylazetat. Vergrößerung: 40000 x. I: innen.

In den Gefrierätzpräparaten zeigt sich der Schichtenbau der Zellwand in besonders ausgeprägter Form (Abb. 4 a-d). Bei entsprechendem Anbruch erscheinen die Zellwandschichten in der Flächenansicht, so daß in einigen Fällen größere Bereiche einer Zellwandschicht in der Aufsicht zu sehen sind (Abb. 4 d).

Während fibrilläre Strukturelemente in ihrer parallelen und transversalen Anordnung deutlich hervortreten (Abb. 4 a, b), sind "konzentrische Strukturelemente" schwierig zu identifizieren. Mögliche Hinweise auf ein Vorliegen solcher Strukturen könnten die Abb. 4 c, d geben.

Abb. 4 a, b

Zellwand. Gefrierätzpräparate. Zellwand, längs, mit deutlich sichtbarer paralleler (⇉) und transversaler (↘) Textur. Die innersten Zellwandschichten (I) sind aufgelockert. Einzelne fibrilläre Strukturelemente sind sichtbar (►). Vergrößerung: (a) 10000 x, (b) 40000 x.

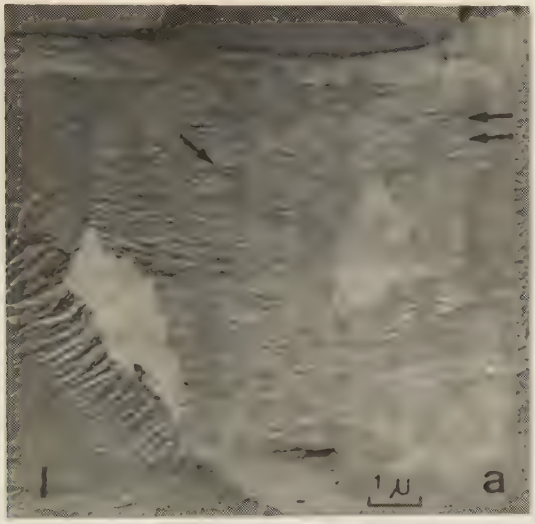


Abb. 4 c, d

Zellwand. Gefrierätzpräparate. Zellwandschichten (S) längs (c) und in der Flächenansicht (Aufsicht) (d) mit fibrillären (►) und möglichen "konzentrischen" ("kugelförmigen") Strukturelementen (▷). Vergrößerung: (c, d) 100000 x. Bedampfungsrichtung (⟶).-(Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Merz für die Überlassung der Aufnahmen.)

1.2. Nachweis, strukturelle und funktionelle Aspekte des Zellwandproteins

Der Nachweis von Proteinen in der Zellwand wurde bisher meistens nur chemisch durch Extraktion von Proteinen bzw. durch Spaltung der Zellwand unter Gewinnung von Peptiden und Aminosäuren geführt (s. z.B. Lamport, 1965, 1970). Darauf basiert auch die z.Z. noch übliche Gliederung der Zellwandproteine in extrahierbare (Enzym-)Proteine und durch hydrolytische Methoden zugängliche Strukturproteine. Die Anordnung und Verteilung der Proteine in der Zellwand ist durch dieses Verfahren allein schwer zu ermitteln (s. auch: Colvin u. Leppard, 1971; Leppard u. Colvin, 1971). Günstiger ist es, o.g. Methoden mit zytochemischen und morphologischen Methoden zu kombinieren. Solche Untersuchungen wurden bis jetzt nur in wenigen Fällen durchgeführt (s. auch: Freundlich u. Robards, 1974).

1.2.1. Lichtmikroskopischer Nachweis

Bei Polyphysa wurde mit den "proteinspezifischen" Farbstoffen Coomassie Blue (CB) (Cheung u. Barber, 1971) und 1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure-Mg-Salz (ANS) erstmals lichtmikroskopisch Protein in der Zellwand nachgewiesen. Es zeigt sich, daß das Protein in der Zellwand nicht homogen verteilt ist. Insbesondere die innere Zellwandschicht erweist sich als relativ proteinreich. Darüberhinaus können mit CB blaugefärbte, feine Schichten in der Zellwand erkannt werden (Abb. 5 a, b). Die Einschlußkörper zeichnen sich ebenfalls durch eine blaue Färbung ihrer zentralen Bereiche aus (Abb. 5 b).

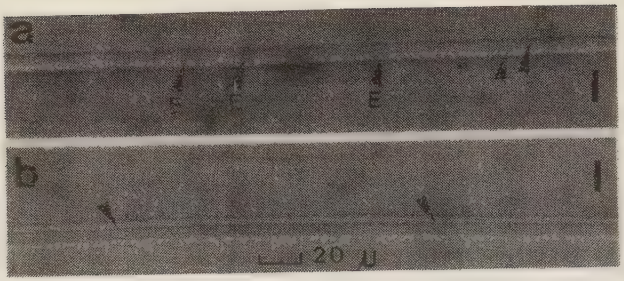


Abb. 5 a, b
Zellwand mit Coomassie Blue gefärbt. Gefärbte Schichten (►) und Einschlußkörper (E►) sind sichtbar. Lichtmikroskopische Aufnahmen. Vergrößerung: (a, b) 400 x. I: innen.

1.2.2. Elektronenmikroskopischer Nachweis

Der elektronenmikroskopische Nachweis von Zellwandprotein erwies sich als schwierig. Durch Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure (PWS) bei pH = 2 und bei pH = 8 (z. Problematik s. auch: Geyer, 1973) und mit Rutheniumrot (Luft, 1966) konnten jedoch einige Hinweise auf den chemischen Charakter von Zellwandstrukturelementen erhalten werden.
Mit PWS, pH = 2, werden die fibrillären und "konzentrischen" Strukturelemente der Zellwand gleichermaßen stark kontrastiert (s. auch:Abb . 12 a). Das Kontrastierungsverhalten ist ähnlich wie mit methanolischem Uranylazetat (Abb. 6a). Mit PWS, pH = 8, dagegen werden die fibrillären Strukturelemente schwach oder gar nicht, die "konzentrischen Strukturelemente" jedoch stark kontrastiert (Abb. 6b).
Rutheniumrot kontrastiert die fibrillären Strukturelemente ebenfalls relativ gering, stark hingegen wiederum die "konzen-

trischen Strukturelemente" . Die in der Zellwand zu beobachtenden, parallel zur Zellängsachse verlaufenden, stärker kontrastierten Zonen sind vermutlich vorwiegend auf eine Häufung der "konzentrischen Strukturelemente" zurückzuführen.

Es wird vermutet, daß vorwiegend das Zellwandprotein mit seinen relativ hohen Glutamin- und Asparaginsäureanteilen für das Kontrastierungsverhalten der Zellwand gegen Rutheniumrot in Frage kommt.

Die "konzentrischen Strukturelemente" dürften nach ihrem Kontrastierungsverhalten vorwiegend aus (Glyko-)Proteinen aufgebaut sein, während die fibrillären Elemente vorwiegend Polysaccharide sein dürften.

Abb. 6 a-c

"Konzentrische" (➤) und fibrilläre Strukturelemente (⟩) in der Zellwand. a: Kontrastierung mit methanolischem Uranylazetat. b: Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure, pH = 8. c: Kontrastierung mit Rutheniumrot. - Vergrößerungen: (a-c) 100000 x. a-c: Längsschnitte. I: innen.

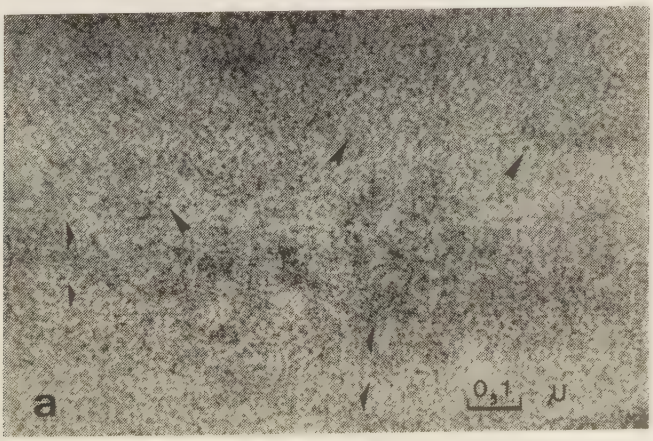
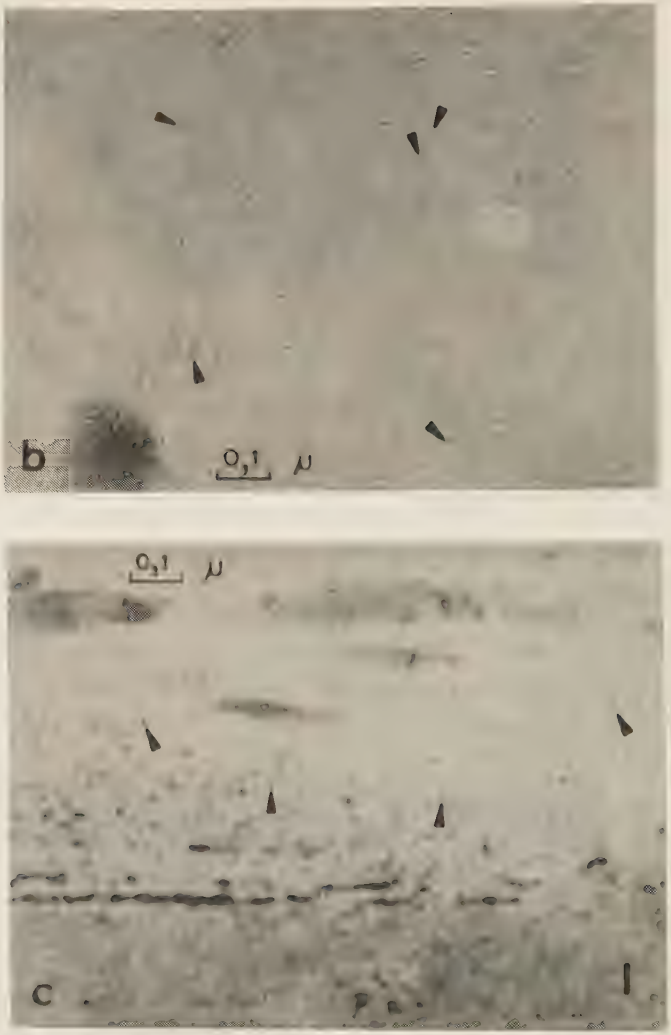


Abb. 6 b, c



1.2.3. Funktionelle Aspekte

Hinweise auf mögliche Beziehungen zwischen Zellwandprotein und Zellwandwachstum ergaben sich aus Versuchen, in denen Zellen verschieden lange mit 2.2'-Dipyridyl (DIP) behandelt wurden. Je nach der Behandlungsdauer stört bzw. hemmt DIP das Spitzenwachstum von Polyphysa. Unter Hemmstoffeinwirkung bleiben die Zellen für eine längere Zeit (bis zu 40 Tagen) lebensfähig und können nach Hemmstoffentzug weiterwachsen (s. auch: Tab. 1; zur möglichen Wirkungsweise von DIP bei Polyphysa s. Diskussion).

Zellen, die zwei Tage mit DIP behandelt wurden und dann bis zu 83 Tagen in Schreiber-Lösung ohne Hemmstoffzusatz weiterwachsen konnten, zeigen z.T. erhebliche Veränderungen in der Zellform und der Zellwandstruktur. Die Zellen erreichen eine im Vergleich zu den Kontrollen große Zellänge und bilden zeitlich verzögert Hüte. Neben normalen entwickeln sich mißbildete Hutkammern und Cysten, und es bilden sich vermehrt Stielcysten (Tab. 1) (Göke, 1972).
Die Zellwandinnenseiten sind vor allem im apikalen Bereich der Zellstiele stark verändert. Sie haben eine warzige Struktur, die durch eine Vielzahl dicht nebeneinanderliegender, mit Coomassie Blue färbbarer, proteinreicher Zellwandeinschlußkörper hervorgerufen wird (Abb. 7 a, b). In Kontrollen treten die Einschlußkörper nur vereinzelt auf (s. auch: Abb. 5a).

Zellen, die für eine längere Zeit mit DIP gehemmt wurden, zeigen mit ANS gegenüber Kontrollzellen stark fluoreszierende Zellwandinnenseiten (Abb. 8 a-d). Dieser Befund zeigt, daß der Proteinanteil der inneren Zellwandschichten stark erhöht ist. Das Protein ist wahrscheinlich Bestandteil von Zellwand-

schichten, die unter Hemmstoffeinfluß aufgebaut werden und die veränderte Struktur der inneren Zellwandbereiche verursachen (s. auch: Abb. 10 a, b; 11 a,b).

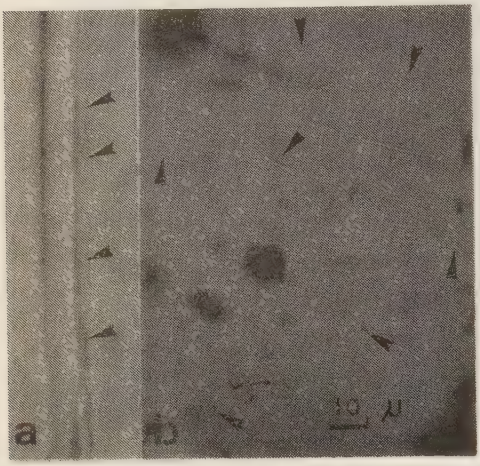
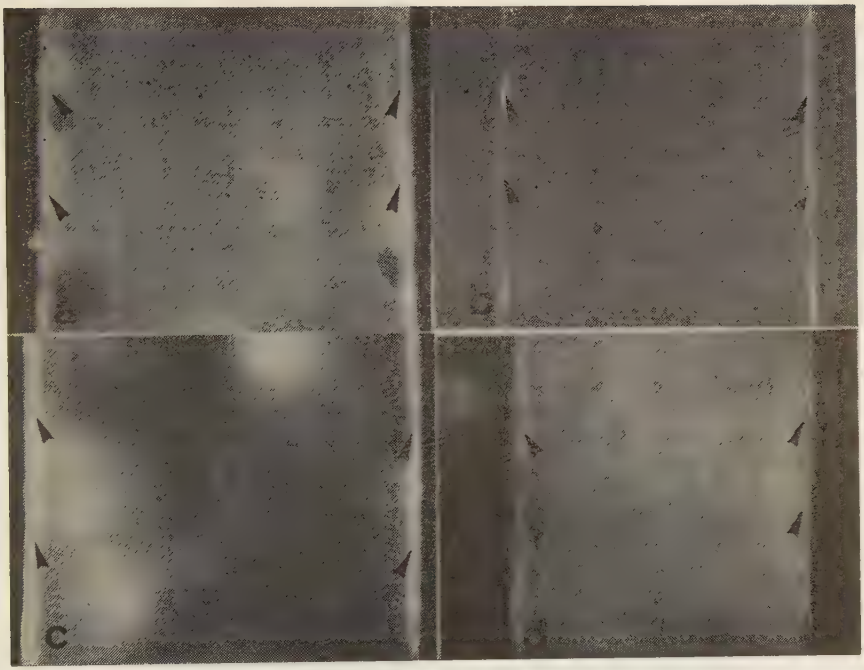


Abb. 7 a, b
Veränderungen der Zellwandinnenseiten der Stielzellwand einer Zelle, die 2 Tage mit DIP behandelt und danach 83 Tage in Schreiber-Lösung belassen wurde. a: Zellwand längs; b: Zellwandinnenseite in der Aufsicht. - Es sind die hellen äußeren bzw. blau gefärbten inneren Bereiche der Einschlußkörper zu sehen (►). Färbung: Coomassie Blue. Lichtmikroskopische Aufnahmen; Vergrößerung: 714 x .

Im Gegensatz zu DIP-behandelten Zellen lassen dunkelgestellte Zellen, die ebenfalls im Wachstum gehemmt sind (s. auch: Werz, 1966), keinen Aufbau proteinreicher, mit ANS stark fluoreszierender Wandschichten erkennen (Abb. 8 d). Die Fluoreszenz scheint sogar noch geringer zu sein als die der Zellwandschichten von Kontrollzellen.

Abb. 8 a-d
Fluoreszenz der Zellwandinnenschichten nach 4-minütiger Inkubation (c: nach 20-minütiger Inkubation) in ANS (►).
a: Kontrolle, b: mit DIP gehemmte Zelle, c: wie (b) aber 20 Minuten in ANS, d: dunkelgestellte Zelle.

Abb. 8 a-d



DIP dürfte analog seiner Wirkungsweise bei höheren Pflanzen auch bei Polyphysa Photosyntheseprozesse und damit wahrscheinlich - bei längerer Anwendung - die Produktion von Zellwandkomponenten, insbesondere Zellwandpolysacchariden beeinträchtigen bzw. hemmen. Daß dennoch Zellwandschichten begrenzt aufgebaut werden können, ist vermutlich auf die Beeinflussung anderer Mechanismen durch DIP zurückzuführen. So erfolgt in gehemmten Zellen sehr wahrscheinlich ein Stärkeabbau (dafür sprechen morphologische Befunde, Abb. 9 a, b), wodurch Zellwandbausteine zur Verfügung gestellt werden könnten. Dunkelgestellte Zellen, die auch Stärke abbauen, zeigen jedoch kei-

nen Aufbau einer Zellwandschicht. Wird die Hemmung aufgehoben, so wachsen die Zellen weiter, was für eine relativ "intakte" Zellwandpolysaccharidbiosynthese spricht. Die während des weiteren Wachstums auftretenden Störungen der Zellformbildung dürften dabei vorwiegend auf Störungen im Zellwandproteinstoffwechsel zurückzuführen sein.

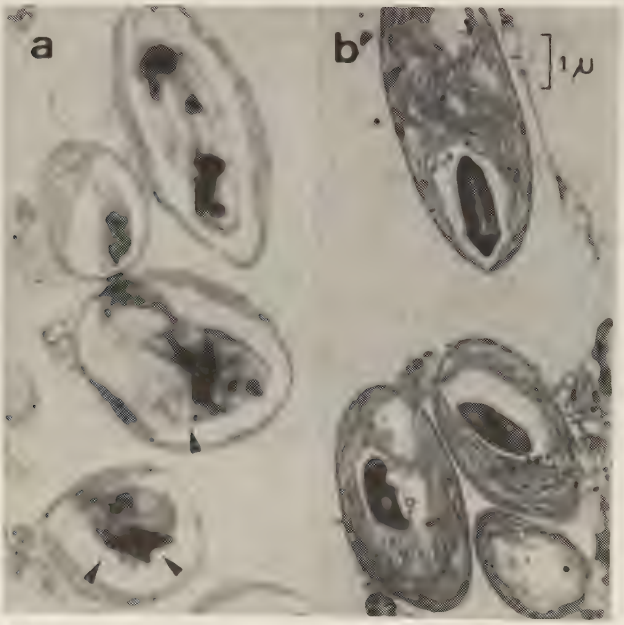


Abb. 9 a, b
Struktur der Plastidenstärke bei DIP-behandelten (a) und bei unbehandelten Zellen (b). Abbauerscheinungen an der Stärke (►). Vergrößerung (a, b): 10000 x.
Dauer der DIP-Behandlung ca. 14 Tage.

Tab. 1

Wachstum und Entwicklung von Polyphysa cliftonii nach verschieden langer Behandlung in einer Lösung von 0.05 mM 2.2'-Dipyridyl in Schreiber-Lösung (DIP) und anschließender Weiterkultur in Schreiber-Lösung ohne DIP (S). Kontrollzellen ebenfalls in Schreiber-Lösung ohne DIP (S). Alle Zellen hatten bei Versuchsbeginn eine Länge von 1 cm.

Versuch	Tage		Länge	Zellen		mit	
Zellzahl	in DIP	in S	der Zellen cm	ohne Hut %	mit Hut %	Cysten im Hut (und im)	Stiel
Kontrolle	-	31	7-8	41	59	8	-
51 Zellen		43	8	-	-	100	-
+ DIP	2	-	1	-	-	-	-
58 Zellen		29	10-11	91	9	-	-
		43	12-14	91	9	-	-
		83	12-16	50	50	10	überwiegend
+ DIP	31	-	1	ca. 80% der Zellen überleben			
60 Zellen		25	5-6	80	20	-	-

1.2.3.1. Feinstruktur der Zellwände gehemmter Zellen

Aufgrund der lichtmikroskopischen Befunde an Zellwänden gehemmter Zellen erschien eine elektronenmikroskopische Untersuchung angebracht. Dabei zeigten sich z.T. erhebliche Veränderungen in der Zellwandstruktur. Die innersten Zellwandschichten sind aufgelockert und besitzen eine ausgeprägte Paralleltextur. Die fibrillären Strukturelemente einiger Zellwandbereiche besitzen eine höhere Affinität zu methanolischem Uranylazetat, sind gröber gebaut und manchmal in regel-

mäßigeren Strukturen angeordnet (Abb. 10 a, b).
Die Zellwandeinschlußkörper sind unterschiedlich groß und besitzen in einigen Fällen einen zentralen, gering strukturierten Bereich, der von fibrillärem Material umgeben ist. Das Material des zentralen Bereichs zeigt eine geringe Affinität zu PWS, pH = 2 (Abb. 11 a), eine starke zu PWS, pH = 8 (Abb. 11 b) und zu Rutheniumrot (Abb. 12 a, b). Die Affinität der inneren Zellwandschicht zu PWS, pH = 8, und zu Rutheniumrot tritt deutlich hervor.
Einschlußkörper und innere Zellwandschichten dürften nach diesen Befunden reich an (Glyko-)Proteinen sein.

Legenden zu den Abbildungen der folgenden Seiten:

Abb. 10 a, b

Längsschnitt durch die Zellwand einer mit DIP behandelten Zelle. Zellwandeinschlußkörper (E) und veränderte innere Zellwandschichten sind sichtbar (⟩).
Kontrastierung: Methanolisches Uranylazetat. Vergrößerung: (a) 40000 x, (b) 20000 x.

Abb. 11 a, b

Längsschnitt durch die Zellwand einer mit DIP behandelten Zelle. a: Kontrastierung mit PWS, pH = 2. Innere Zellwandschicht gering kontrastiert (⟩). Auffällig ist der gering strukturierte innere Bereich des Einschlußkörpers (E).
b: Kontrastierung mit PWS, pH = 8. Starke Kontrastierung in der inneren Zellwandschicht (⟩). Vergrößerung:
(a) 36000 x, (b) 20000 x

Abb. 10 a, b

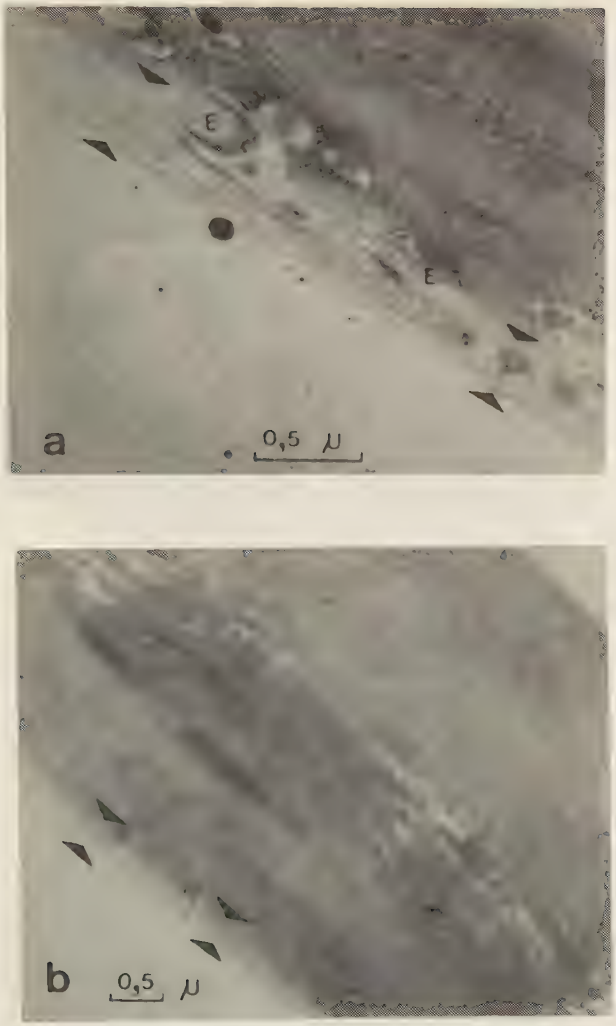


Abb. 11 a, b

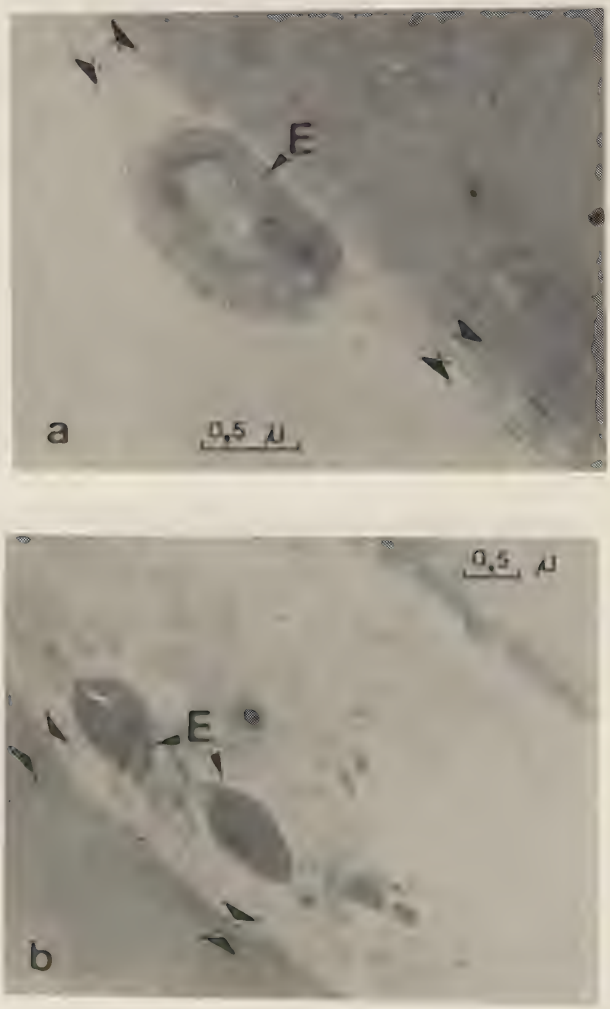
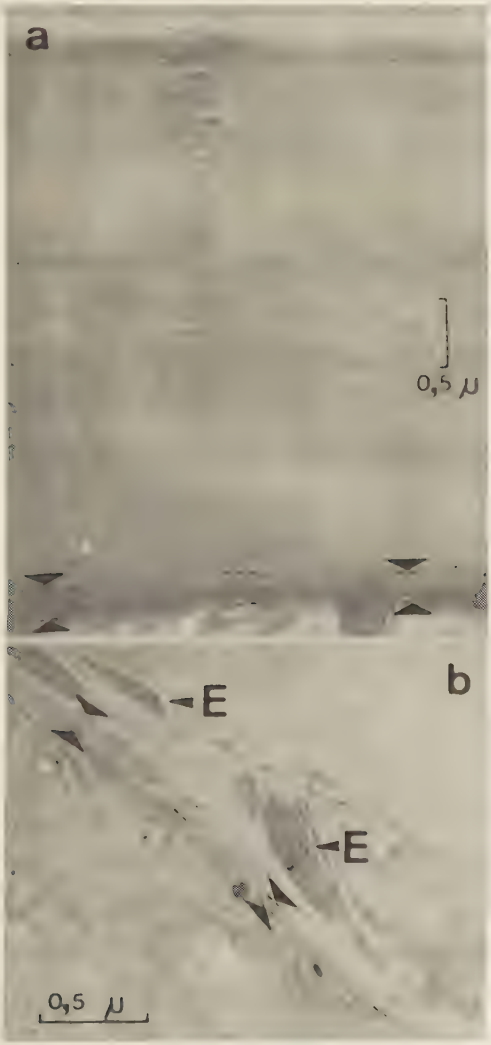


Abb. 12 a, b

Längsschnitte durch die Zellwand einer mit DIP behandelten Zelle. Kontrastierung mit Rutheniumrot. Stärkere Kontrastierung in den Zellwandinnenschichten ( ) und Einschlußkörpern (E). Vergrößerung: (a) 26000 x, (b) 40000 x.



2. Chemie der Zellwand

Über die chemische Zusammensetzung der Zellwand von Polyphysa bestehen insbesondere auch im Hinblick auf die Polysaccharide nur wenige Kenntnisse (s. auch: Werz, 1963). Daher wurden neben der Zusammensetzung des Zellwandproteins auch die Zusammensetzung der Stielzellwandpolysaccharide untersucht. (Eine ausführliche Untersuchung der Stielzellwandpolysaccharide war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.)

2.1. Zellwandpolysaccharide

Die gereinigte Stielzellwand enthält Mannose, Galaktose, Rhamnose und wahrscheinlich auch Glukose (s. auch: Werz, 1963; Zetsche, 1967). Mannose stellt den größten Anteil. Sie wird bei Zimmertemperatur durch 6 N HCl sowie durch 0.5 N KOH nur in Spuren freigesetzt. Konzentrierte Ameisensäure, hier als Agens zum Lösen von Zellwänden verwendet, setzt bei Zimmertemperatur keine oder nur Spuren von Mannose frei. Erhöht man die Inkubationstemperatur, so tritt Mannose neben anderen Zuckern verstärkt ab 60° C auf.

Die anderen Monosen liegen in eineinhalbfach geringerer Konzentration als die Mannosekonzentration vor. Unter verschiedenen Hydrolysebedingungen verhalten sie sich z.T. ähnlich wie die Mannose. Glukose wird nicht oder nur in Spuren gefunden. Galaktose und Rhamnose treten nach zweistündiger Hydrolyse in 1 und 2 N HCl bei 110° C auf.

Für die quantitative Bestimmung der Hexosen wurden nach Vorversuchen 2-Stunden-Hydrolysate von 2- und 5-mg-Portionen verwendet. In ihnen wurde der Gesamthexosegehalt nach der Phenol-

Methode (Dubois, 1956) bestimmt. Die Stielzellwand enthält danach 50 - 54 % Hexose als Mannose gemessen. (Zum Vergleich: Hutzellwand enthält 40 - 44 %.)

Über den genauen Aufbau der Stielzellwandpoly- bzw. -oligosaccharide ist nichts bekannt. Wahrscheinlich liegt in der Zellwand von Polyphysa - ähnlich wie in der von Acetabularia calyculus (Miwa et al., 1961) - ein ß-1.4-Mannan als (fibrilläres) Strukturpolysaccharid vor (s. auch: Frei u. Preston, 1968).

2.2. Zellwandprotein

Aus den gereinigten Zellwänden sind 16 - 17 Aminosäuren durch saure Hydrolyse freisetzbar (Abb. 13). Hydroxyprolin und Prolin - charakteristisch für das Zellwandprotein Extensin (Lamport, 1965) - fehlen bzw. sind nur in Spuren vorhanden. Es fällt der hohe Anteil saurer sowie kurzkettiger neutraler Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure; Alanin, Glycin) auf (Tab. 2).

Der Gesamtaminosäuregehalt der gereinigten Zellwand beträgt 4.7 - 10 /ug Aminosäure/100 /ug Zellwand (Göke et al., 1974). Dieser Wert liegt, wahrscheinlich durch die Hydrolyse bedingt, zu niedrig. - Für die Bestimmung des Proteingehalts wurde vom Stickstoffgehalt der Zellwand ausgegangen. Nach Umrechnung des Stickstoffgehaltes mit dem üblichen Faktor 6.23 ergibt sich ein ungefährer Proteingehalt von 29 - 30 /ug/100 /ug Zellwand.

Die in der Einleitung genannten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Zellwände der artspezifischen Zellstrukturen Stiel und Hut gehen aus Abb. 13 und Tab. 2 hervor.

Anders als die Aminosäurezusammensetzungen zeigen die IR-Spektren der Zellwände beider Zellstrukturen nur geringe Unterschiede (Abb. 14).

2.3. Andere Zellwandbestandteile

Stielzellwände enthalten 4 - 5 % Phosphor. Ob er z.B. als Bestandteil von Phospholipiden und/oder Phosphomannanen vorliegt ist noch offen.

Tab. 2

Relative Aminosäurezusammensetzung (%) der gereinigten Stielzellwände von Polyphysa (a). Zum Vergleich die Aminosäurezusammensetzung der Hutzellwände (a). (b) Aminosäureanteile jeweils relativ zum Prolingehalt. unid.: unidentifizierte, ninhydrinpositive Substanzen.

	Stiel		Hut	
	a	b	a	b
GLY	11.50	132.25	10.90	98.75
ALA	17.17	197.50	14.55	131.75
LEU	6.04	69.50	6.54	59.25
I-LEU	2.61	30.00	2.82	25.50
VAL	8.02	92.25	10.65	96.50
SER	7.17	82.50	5.27	47.75
THR	4.48	51.50	4.08	37.00
ASP	12.61	145.00	12.78	115.75
GLU	11.98	137.75	12.61	114.25
ARG	2.45	28.25	2.24	20.25
LYS	6.35	73.00	2.62	23.75
PHE	3.50	40.25	3.12	28.25
TYR	4.41	50.75	3.26	29.50
MET	0.17	2.00	0.14	1.25
HIS	0.48	5.50	4.31	39.00
PRO	0.08	1.00	0.11	1.00
HYPRO	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
unid.	0.98	------	4.00	------

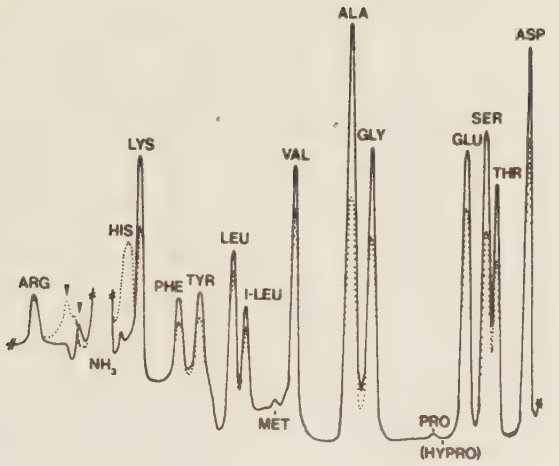


Abb. 13
Aminosäurezusammensetzung der gereinigten Stielzellwände von Polyphysa (———). Zum Vergleich die Aminosäurezusammensetzung der gereinigten Hutzellwände (····). Die Gesamtmenge der Aminosäuren betrug 11.7 bzw. 10.2 µg/100 µl Hydrolysat (≙etwa 0.1 mg Zellwand). Unidentifizierte ninhydrin-positive Substanz (▼▼).

3. Durch Lösungsmittel modifizierte Zellwand und ihr Protein

Mittels verschiedener Kontrastierungsmethoden war es möglich Strukturelemente in der Zellwand darzustellen und ihre chemische Natur wahrscheinlich zu machen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß nur bestimmte Bestandteile der Zellwand elektronenmikroskopisch strukturell zu erfassen sind. So sind z. B. Fibrillen darstellbar. Bestandteile, die die Fibrillen als Matrix umgeben sind aber kaum bzw. schwierig strukturell zu

Abb. 14

IR-Spektrum von gereinigter Stielzellwand von Polyphysa (——). Zum Vergleich das Spektrum der Hutzellwand (···). Es wurden jeweils 4 mg trockene Zellwand in einer KBr-Pille untersucht. Die Banden im Bereich > 2700 cm^{-1} sind für die Polysaccharidkomponente (Mannan) charakteristisch. Denkbar ist, daß zur Ausbildung der Bande im Bereich > 3000 cm^{-1} auch das Protein der Zellwand beiträgt. Die Bande bei ≈1650 cm^{-1} kann sehr wahrscheinlich als Amid I-Bande angesehen werden. Im Falle der Banden im Bereich < 1500 cm^{-1} ist aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Zellwand keine Zuordnung zu Zellwandbestandteilen möglich.

erfassen. Weiterhin muß davon ausgegangen werden, daß Polysaccharide unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung elektronenmikroskopisch ähnliche fibrilläre Strukturen besitzen können. Es ist daher problematisch, aus der elektronenmikroskopischen Darstellung von Zellwandkomponenten Vorstellungen über ihren "wahren" Bau abzuleiten.

Eine zusätzliche Möglichkeit, Kenntnisse über den strukturellen und chemischen Bau von Zellwandkomponenten zu erhalten besteht darin, Zellwände z.B. mit enzymatischen Methoden oder durch Anwendung von Lösungsmitteln schonend in Zellwandkomponenten zu zerlegen.

Bei der Darstellung von Zellwandkomponenten aus der Zellwand von Polyphysa wurde von der Annahme ausgegangen, daß ein Schritt bei der Zellwandbildung im "spontanen" Zusammentreten von komplex gebauten Zellwandvorstufen über aggregationsfähige Zellwandproteine bestehen könnte (s. auch: Roberts, 1974; Roland et al., 1977). Analog dazu sollten sich Zellwandkomponeten durch ein proteinlösendes Agens schonend voneinander trennen lassen.
Mit Ameisensäure, einem Lösungsmittel für Proteine (Singer, 1962) konnte die Zellwand gelöst werden. Die dabei erhalten gebliebene Aggregationsfähigkeit von Zellwandkomponenten (Abschnitt 3.2.1.) kann als Hinweis auf einen schonenden Löseprozeß und auf "intakte" Zellwandkomponenten gewertet werden.

Zum Vergleich wurden die Löslichkeit der Zellwand in $ZnCl_2$-Lösung (Miwa et al., 1961) und die aus den entsprechenden Lösungen zu gewinnenden Zellwandkomponenten untersucht.
Auf die Löslichkeit der Zellwand in Zn_2Cl-Lösung und in Ameisensäure sowie auf die entstehenden Zellwandkomponenten soll im folgenden eingegangen werden.

Einen Überblick über die Fraktionierung der Zellwand mit Ameisensäure und mit $ZnCl_2$-Lösung (s. auch: Miwa et al., 1961) gibt Tab. 3.

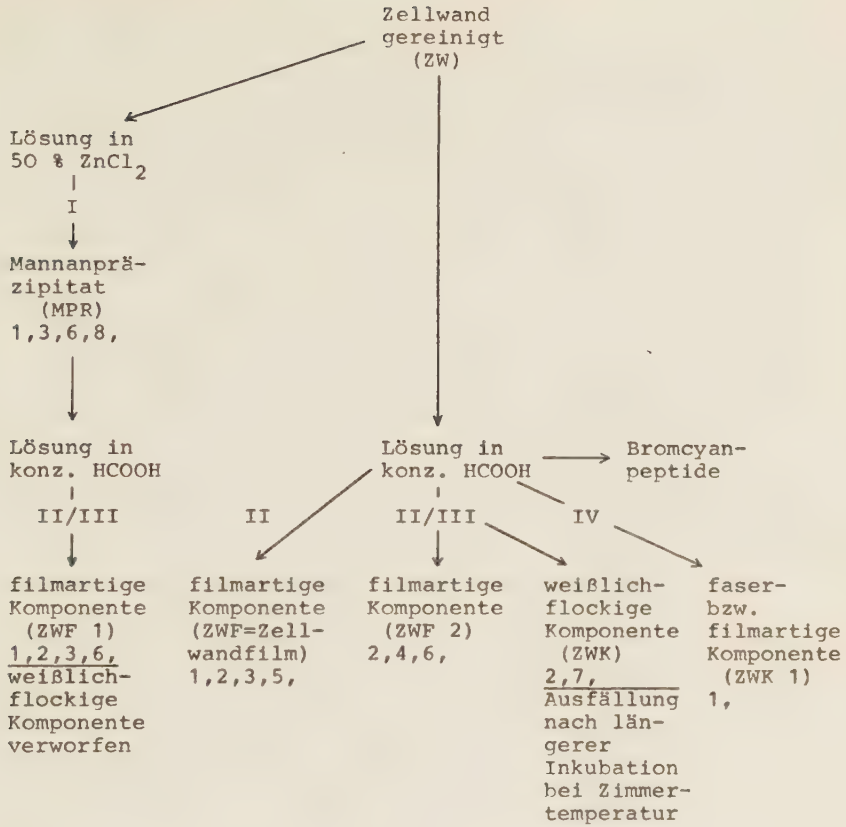
3.1. Behandlung der Zellwand mit $ZnCl_2$-Lösung

Das hydratisierte Zn^{2+}-Ion führt in der Zellwand zunächst zu einer starken Quellung - und bei Raumtemperatur - zu einer teilweisen Trennung der Zellwandschichten. Dabei gehen Komponenten in Lösung, die ein für Peptide charakteristisches Spektrum mit einem Maximum bei 210 nm zeigen (Abb. 15 a). Bei längerer Lösezeit, z.B. 63 Tagen, verändern sich die Spektren etwas; die Absorption bei 260 und bei 280 nm nimmt zu (Abb. 15 a).

Nach 4 - 5 1/2-stündiger Inkubation bei 70° C in $ZnCl_2$-Lösung ist die Zellwand stark disintegriert. Das Spektrum der Lösung ist dem oben beschriebenen Spektrum ähnlich - nur daß bei den genannten Wellenlängen die Absorption stark erhöht ist. Das erst nach längerer Inkubation (vor allem bei höherer Temperatur) zu beobachtende Auftreten von aromatischen Aminosäuren in der Lösung könnte als Hinweis auf die Existenz von unterschiedlich zusammengesetzten Proteinkomponenten gedeutet werden.

Aromatische Aminosäuren bleiben im Rückstand (Abb. 15 b), wenn aus einer bei 70° C hergestellten Lösung mit Aceton die Mannankomponente präzipitiert wird (s. auch: Tab. 3; MPR).

Der aus der Mannankomponente (MPR) mit Hilfe von Ameisensäure erhaltene Film (ZWF 1; Tab. 3) ergibt in Natronlauge gelöst ein für Peptide charakteristisches Spektrum; aromatische Aminosäuren sind danach nicht oder kaum in dem Film ent-



Tab. 3

Fraktionierung der Zellwand mit Ameisensäure und $ZnCl_2$. Zeichen: ZWF=Zellwandfilm; ZWK=Zellwandkomponente; MPR=Mannanpräzipitat. - I: Fällung mit Aceton und Waschen des Präzipitats. II: Lösung zur Trockene eingeengt und Rückstand in Wasser aufgenommen. III: Ausflockende Komponente abgetrennt. IV: Proteinkomponente mit Hexafluorisopropanol gefällt. 1: anisotrop; 2: hydrophob; 3: feucht: flexibel; 4: feucht: starr-brüchig, 5: trocken: flexibel; 6: trocken: starr-brüchig; 7: trocken: glasartig-amorph; 8: fasrig (fibrillär).

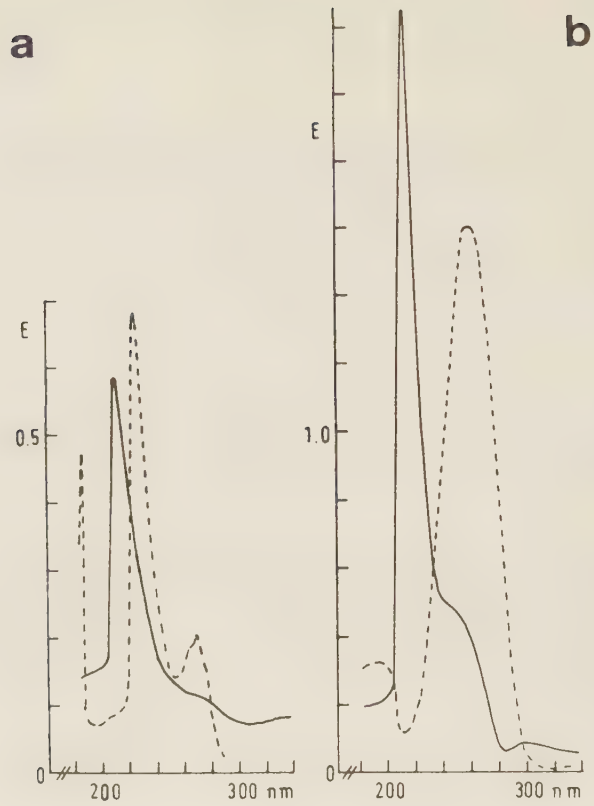


Abb. 15 a, b

UV-Spektren von Zellwand-$ZnCl_2$-Lösungen. a: Lösungen von Zellwand in 50 % $ZnCl_2$ nach 25 (———) und nach 63 (----) Tagen bei Raumtemperatur. Zellwandeinwaage: 1 und 2 mg/ml. b: Lösungen, aus denen nach 4-stündiger (———) und nach 5 1/2 stündiger (----) Inkubation von Zellwand in $ZnCl_2$ bei 70° C das Mannan präzipitiert wurde. Das Aceton wurde vor dem Messen durch Einengen der Lösungen im Vakuum (bis zum Verschwinden des Aceton-Spektrums) entfernt. - Mit zunehmender Inkubationsdauer treten aromatische Komponenten (Aminosäuren) deutlicher hervor. Zellwandeinwaage: 2 mg/ml.

halten (Abb. 19).

3.1.1. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Mannanpräzipitats (MPR)

Lichtmikroskopisch gesehen besteht das Mannanpräzipitat aus einer fasrigen und einer "amorphen" Komponente. Die Fasern sind anisotrop. Sie haben einen Durchmesser von etwa 0.3 /um und sind bis zu 40 /um lang.

Elektronenmikroskopisch wurden Mannane verschiedener Herkunft von Meier (1958) sowie von Mackie und Preston (1968) untersucht.

Die Dasycladaceen Codium und Acetabularia crenulata enthalten nach Mackie u. Preston (1968) ein fibrilläres Mannan, dessen Fibrillen nur nach schonender Präparation darstellbar sind. Ihre Durchmesser betragen 5 - 25 nm (s. auch: Werz, 1970 b). Die Fibrillen der Mannankomponente B aus Ivory-Mannan (Meier, 1958) sollen einen relativ labilen Bau besitzen, der bereits durch Umfällen zerstört werden kann.

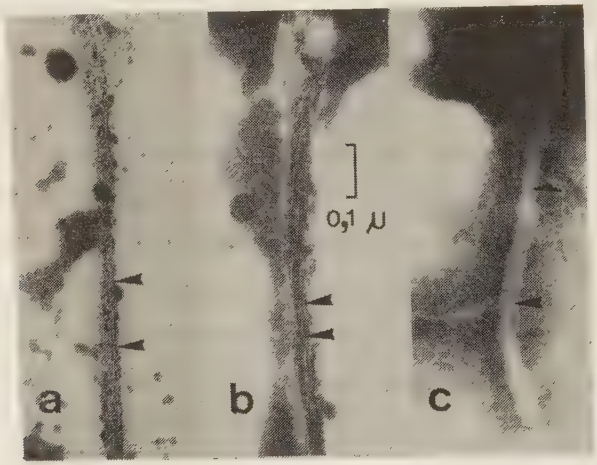
Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Mannanpräzipitate von Polyphysa zeigte, daß fasrige bzw. fibrilläre sowie nicht näher identifizierbare amorphe Bestandteile vorliegen.

Die Fibrillen verlaufen in Abständen von 3 - 5 nm vorwiegend starr parallel. Sie sind offensichtlich über "sprossenartig" angeordnete Komponenten miteinander verbunden (Abb. 16 a-c). Mehrere Fibrillen sind zu "Makrofibrillen" organisiert.

Die Zusammensetzung der Fibrillen und die der amorphen Bestandteile sind nicht genau bekannt. Wahrscheinlich dürften die Fibrillen vorwiegend aus ß-1.4-Mannan bestehen. Da im

Mannanpräzipitat aber auch Proteine vorkommen (Abb. 19/2), ist zu vermuten, daß auch sie an der Zusammensetzung der Fibrillen und/oder der amorphen Komponente beteiligt sind.

Abb. 16 a-c
Fibrilläre (und amorphe ?) Bestandteile des Mannanpräzipitats. Fibrillen (►) negativkontrastiert (PWS). Vergrößerung: (a-c) 100000 x.



Im Gefrierätzpräparat (Abb. 17) weist das Mannanpräzipitat unregelmäßig zueinander orientierte Strukturelemente auf. Ihre Durchmesser betragen ungefähr 10 nm. Die Strukturelemente scheinen jeweils aus zwei parallel verlaufenden, fibrillenartigen Komponenten, die z.T. von"Hüllsubstanzen" umgeben sind, aufgebaut zu sein. Die fibrillenartigen Komponenten dürften den Fibrillen im negativkontrastierten Präparat entsprechen.
Hinsichtlich des paarigen Aufbaus und des Durchmessers besitzen die Strukturelemente Ähnlichkeit mit den fibrillären Strukturelementen der Zellwand.

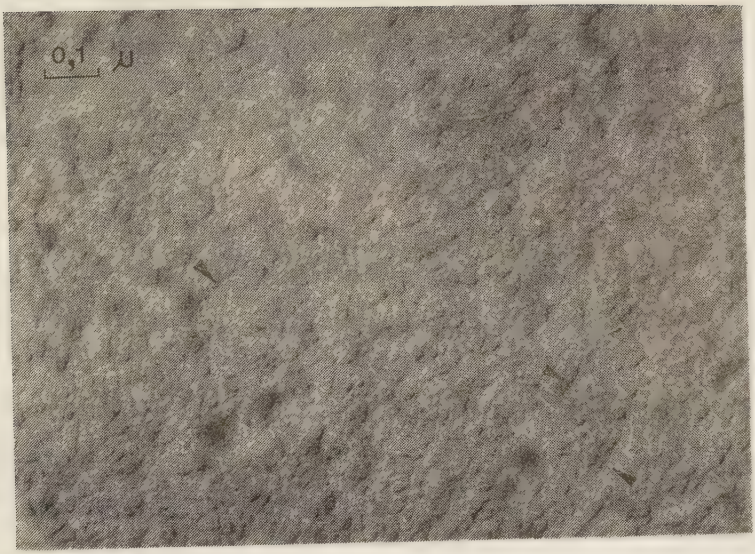


Abb. 17
Mannanpräzipitat. Gefrierätzpräparat. Strukturelemente bestehend aus fibrillenartigen Komponenten sind sichtbar (►). Vergrößerung: 100000 x.

Wird das Mannanpräzipitat in Ameisensäure gelöst (s. auch: Tab. 3), so bleibt die Fibrillenstruktur offensichtlich nicht erhalten. Ähnlich wie in der später noch zu besprechenden Komponente ZWF 2 treten aus je zwei Helixsträngen (Ø eines Stranges etwa 8 nm) aufgebaute Helices auf. Ob die Helixstränge aus paarig aufgebauten Fibrillen (Ø etwa 10 nm) durch Umlagerung oder aus anderen Komponenten hervorgegangen sind, ist nicht bekannt.

3.2. Behandlung der Zellwand mit Ameisensäure

Das Lösen von Proteinen oder proteinhaltigen Strukturen (z.B. Zellwänden) dürfte bei Raumtemperatur vorwiegend auf einem Lösen von Wasserstoffbrücken in den Proteinen beruhen (s. auch: Singer, 1962).

Es wurde hier das Löseverhalten der Zellwand in Ameisensäure in Abhängigkeit von der Lösetemperatur und -dauer untersucht. Als Kriterien für die Stabilität und die Integrität der gelösten Zellwandkomponenten (s. auch: Abschnitt 3.) wurde das Auftreten von Spaltprodukten in den Lösungen und die Fähigkeit gelöster Zellwandkomponenten zu aggregieren herangezogen. Die Spaltprodukte wurden dünnschichtchromatographisch untersucht.

Bei 20 - 30° C erfordert die vollständige Lösung der Zellwand Tage bis Wochen. Dabei werden, wie bereits festgestellt, nur geringe Mengen an Aminosäuren und Zuckern in der Lösung freigesetzt. Bei niedrigen Temperaturen dürfte der Löseprozeß daher nur in geringem Maße mit einer Hydrolyse der Zellwandkomponenten einhergehen. Die Spektren zeigen im Falle dieser Zellwand-Ameisensäure-Lösungen Maxima bei 210, 250, 260, 280 nm (bei 250 und 280 nm als Schultern).

Bei höheren Temperaturen, 50 -100° C, verläuft der Löseprozeß kontinuierlicher als bei Raumtemperatur. Das Spektrum zeigt ausgeprägte Maxima bei 210, 250, 260 und 280 nm (Abb. 18 a).

Aminosäuren und Zucker werden vermehrt freigesetzt, was auf eine zunehmende Hydrolyse der Zellwandkomponenten hinweist. So treten nach 2-stündiger Inkubation bei 60° C Mannose, Ga-

laktose, Glycin, Alanin, Valin, Methionin, Threonin, Phenylalanin sowie nicht weiter identifiziertes ninhydrin- und anilinphthalat-positives Material auf.

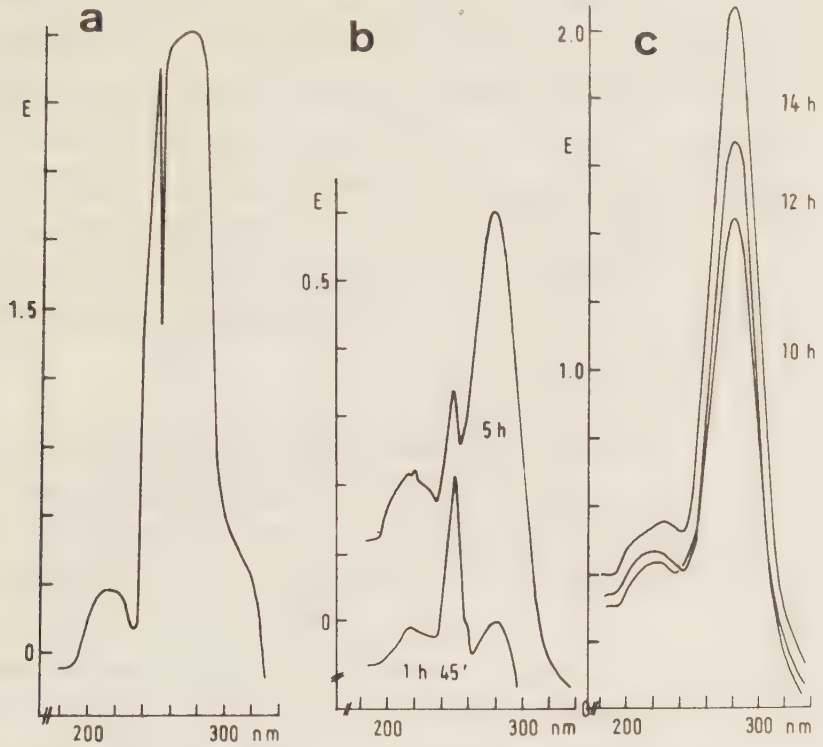


Abb. 18 a-c

UV-Spektren von Zellwand-Ameisensäure-Lösungen. a: Nach zweistündiger Inkubation bei 60° C. - b, c: Nach jeweils mehrstündiger Inkubation bei 100° C; Konzentrationen (b, c): 2 mg Zellwand/1.5 ml konz. Ameisensäure; Inkubation in zugeschmolzenen Glasampullen.

Während der Inkubation bei 100° C werden neben den o.g. Komponenten Leucin, Serin, Asparagin-, Glutaminsäure und aromatische Aminosäuren zunehmend freigesetzt. Die Anteile

an aromatischen Aminosäuren nehmen bei 100° C bis zu einer Inkubationsdauer von 18 Stunden linear zu. Danach erfolgt offensichtlich keine weitere Freisetzung. (Als Maß dienten hier die Änderungen der Extinktionen der Lösungen bei 280 nm.) Die zunehmende hydrolytische Destruktion der Zellwandkomponenten mit steigender Lösetemperatur wird auch an der Abnahme der Aggregationsfähigkeit der Zellwandkomponenten (Abschnitt 3.) deutlich. Aus Lösungen, die bei Raumtemperatur hergestellt werden, lassen sich mechanisch stabile Zellwandfilme (ZWF; Tab. 3) gewinnen.Aus Lösungen, die bei 60 - 70° C bzw. bei 100° C hergestellt werden, lassen sich nur noch mechanisch instabile bzw. keine Filme mehr gewinnen.

3.2.a. Stabilität und+Eigenschaften der gelösten Zellwandkomponenten nach langer Inkubation in Ameisensäure

Eine 90-tägige Inkubation von Zellwand-Ameisensäure-Lösungen bei Raumtemperatur führte in zwei Fällen zu einer Aufspaltung der gelösten Zellwand in zwei Komponenten (ZWF 2 u. ZWK; Tab. 3). Obwohl dieser Vorgang nicht reproduziert werden konnte, wurden die nur in geringen Mengen vorliegenden Komponenten spektroskopisch, elektronenmikroskopisch und röntgenographisch untersucht. Der weißliche Niederschlag (ZWK) in der Zellwand-Ameisensäure-Lösung wurde abzentrifugiert und lyophilisiert. Er wurde nur röntgenographisch untersucht (Tab. 4). ZWF 2 wurde durch Einengen des verbliebenen Überstandes zur Trockene und nach Wasserzusatz gewonnen. Es ist ein durchscheinender, brüchiger, hydrophober Film. Er ist in 1 N Natronlauge gut löslich; das Spektrum der Lösung hat ein Maximum nahe bei 220 nm (Abb. 19). Zusammen mit den d-Werten vom Röntgenbeugungsdiagramm (Tab. 4)

+) andere

spricht das für das Vorliegen einer vorwiegend proteinhaltigen Komponente. Ihr Spektrum gleicht dem der Komponente ZWF 1 (Abb. 19). Beide Komponenten unterscheiden sich in ihren mechanischen Eigenschaften (Tab. 3). ZWF 2 ist im Gegensatz zu ZWF 1 mechanisch relativ instabil und ähnelt damit den instabilen Filmen, die nach Inkubation von Zellwand-Ameisensäure-Lösungen bei 60 - 70° gewonnen werden.

Elektronenmikroskopisch weist die Komponente ZWF 2 helikale Strukturen auf, die aus je zwei Helixsträngen (Ø eines Stranges etwa 8 nm) bestehen (s. auch: Abschnitt 3.1.1.).

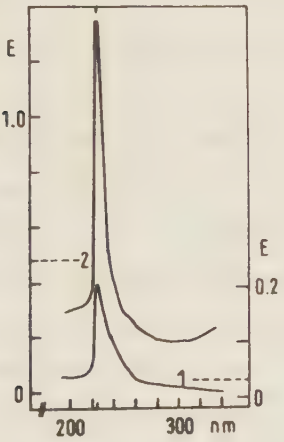


Abb. 19
UV-Spektren der Lösungen von Zellwandkomponenten in 1 N Natronlauge.
1: Filmartige Komponente ZWF 2.
2: Filmartige Komponente ZWF 1 (aus Mannanpräzipitat MPR).

3.2.1. Aggregation von Zellwandkomponenten

Einleitend wurde darauf hingewiesen, daß auch bei der Zellwandbildung Mechanismen wirksam werden könnten, die auf einer Aggregation von Makromolekülen und/oder komplex organisierten Zellwandvorstufen beruhen.

In diesem Zusammenhang ist die Aggregationsfähigkeit von Zellwandkomponenten aus Zellwand-Ameisensäure-Lösungen sowie

aus Lösungen von Mannanpräzipitat in Ameisensäure von Interesse. Durch Einengen solcher, bei Raumtemperatur hergestellten Lösungen im Vakuum lassen sich an den Gefäßinnenseiten haftende Zellwandfilme (ZWF; ZWF 1) darstellen und nach Wasserzusatz gewinnen (Tab. 3). Beide Zellwandfilme sind durchscheinend, anisotrop und (leicht) hydrophob wie die Zellwand.
ZWF ist mechanisch stabil und hat eine ähnliche Zusammensetzung wie die Zellwand. ZWF 1 ist anders zusammengesetzt (geringer Kohlehydratgehalt, andere Aminosäurezusammensetzung) und besitzt eine geringere mechanische Stabilität.
Anders als im Falle von ZWF entsteht bei der Herstellung von ZWF 1 nach Wasserzusatz neben der filmartigen eine weißflockige Komponente, die sich mechanisch abtrennen läßt.
Die weißflockige Komponente enthält sehr wahrscheinlich einen großen Teil der bei der Einwirkung von Ameisensäure auf das Mannanpräzipitat (MPR) abgespaltenen Poly- bzw. Oligosaccharide; denn der Film ZWF 1 weist - wie erwähnt - nur einen geringen Kohlehydratgehalt auf. Die Löslichkeit und das Spektrum (Abb. 19) von ZWF 1 in Natronlauge, die Löslichkeit in Ameisensäure und die d-Werte seines Röntgenbeugungsdiagramms (Tab. 4) zeigen, daß er vorwiegend aus Protein besteht.
Die Aggregationsfähigkeit von Zellwandkomponenten (Bildung von Filmen) dürfte daher sehr wahrscheinlich (vorwiegend) auf Proteinen beruhen. Ein weiterer Hinweis darauf ist auch, daß die Aggregationsfähigkeit von gelösten Zellwandkomponenten abnimmt, wenn aus ihnen durch Hydrolyse zunehmend Aminosäuren abgespalten werden (s. auch: Abschnitt: III/3.2.).
Über die genaue Zusammensetzung, Größe und Form der gelösten Zellwandkomponenten ist noch nichts bekannt. Streulichtmessungen an Zellwand-Ameisensäure-Lösungen, an Zellwand-$ZnCl_2$-Lös-

sungen sowie an Lösungen von Mannanpräzipitat (MPR) in Ameisensäure haben ergeben, daß die Teilchengrößen im Durchschnitt bei 120 - 250 nm und (für die beiden letztgenannten Lösungen) bei 250 nm liegen. Ob die Befunde auf eine einheitliche Größe der aggregierfähigen Komponenten hinweisen muß noch offenbleiben.

3.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Zellwandfilms (ZWF)

Lichtmikroskopisch zeigt sich, daß der Zellwandfilm etwas inhomogen und anisotrop aufgebaut ist. In einigen Bereichen weist er eine schwach sichtbare "netzförmige" innere Struktur auf.

Elektronenmikroskopisch zeigen durch Antrocknen von Zellwand-Ameisensäure-Lösungen auf Objektträgernetze gewonnene Zellwandfilme gegen Uranylazetat, Phosphorwolframsäure pH = 2 und pH = 8 ein ähnliches Kontrastierungsverhalten wie die Zellwand. So wird mit PWS bei pH = 2 eine "fasrige" Grundstruktur erkennbar, während mit PWS pH = 8 eine mehr auf "partikelartige" Bereiche beschränkte Kontrastierung erfolgt. Eine eingehende Untersuchung der Feinstruktur war an diesen Proben wegen ihrer geringen Stabilität im Elektronenstrahl nicht möglich.

Es wurden daher Gefrierätzpräparate von einem Zellwandfilm hergestellt, der auf übliche Weise durch Einengen einer Zellwand-Ameisensäurelösung im Vakuum gewonnen worden war.

In den Gefrierätzpräparaten (Abb. 20 a, b) liegen Strukturelemente vor, die jeweils aus zwei parallel verlaufenden, fibrillenartigen Komponenten bestehen. Ihr Durchmesser beträgt

etwa 10 nm.
Daneben treten zahlreiche Strukturelemente auf, die einen Durchmesser von etwa 10 (20) nm besitzen und deren Aufbau als konzentrisch bezeichnet werden kann.

Größe und Form der hier vorliegenden fibrillenartigen Strukturelemente sprechen für eine Ähnlichkeit mit denen der Mannanpräzipitate (Abschnitt 3.1.1.) und für eine enge Beziehung zu den fibrillären Strukturelementen der Zellwand (Abschnitt 1.1.). Das im Vergleich zum Mannanpräzipitat schwächere Hervortreten der Strukturelemente dürfte auf eine geringere Extraktion und Auswaschung von Strukturbestandteilen während des Lösens der Zellwand in Ameisensäure und der Herstellung des Zellwandfilms zurückzuführen sein.

Die konzentrisch aufgebauten Strukturelemente könnten aufgrund ihrer Größe und Form den "konzentrischen Strukturelementen" der Zellwand entsprechen (Abschnitt 1.) und eine kugelförmige Gestalt besitzen.
Sollten sich diese Strukturen von den Strukturelementen der Zellwand herleiten, so spräche das dafür, daß letztere chemisch distinkte Zellwandbestandteile darstellen. Diese wären gegenüber Ameisensäure relativ stabil und würden ihre Struktur beibehalten oder nach Entzug des Lösungsmittels zurückbilden.
Um diese Probleme zu klären, wären weitere Untersuchungen über die Gefrierätzung von Zellwandfilmen und Untersuchungen an Dünnschnitten von Zellwandfilmen erforderlich.

Abb. 20 a, b

Zellwandfilm. Gefrierätzpräparate. Strukturelemente bestehend aus fibrillenartigen Komponenten sind sichtbar (►). Im Vergleich zu den Strukturelementen im Mannanpräzipitat (Abb. 17) treten sie jedoch schwächer hervor. Daneben liegen Strukturelemente vor, deren Aufbau als konzentrisch bezeichnet werden kann (▷). Vergrößerung: (a, b) 100000 x.

4. Röntgenographische Untersuchungen der Zellwand und der Zellwandkomponenten im Hinblick auf ihr Protein

Die Beziehungen von Zellwandproteinen zu Strukturveränderungen in der Zellwand könnten möglicherweise röntgenographisch direkt verfolgt werden, wenn Zellwandproteine im Röntgendiagramm der Zellwand distinkte Reflexe verursachen würden. Um dieses zu untersuchen, wurden die nach $n\lambda = 2\ d \sin \Theta$ aus den Beugungsdiagrammen von Zellwänden wachsender Zellen (ZW), nicht wachsender Zellen (ZW-DIP), von Mannan I (M I) (Werte aus Tab. 9.1 aus Preston, 1974; s. auch: Frei u. Preston, 1968), von Zellwandkomponenten ZWF 1, ZWF 2, MPR und ZWK 1 (isoliertem Zellwandprotein, nach Tab. 5) zu erhaltenden d-Werte (Netzebenenabstände) miteinander verglichen.

Der Vergleich mit den d-Werten von Mannan I erscheint insofern zulässig, als auch in der Zellwand von Polyphysa ein ß-1.4-Mannan als Strukturpolysaccharid wahrscheinlich ist. Eine vorsichtige Interpretation ist nur insofern geboten, da kaum etwas über den Einfluß anderer Zellwandbestandteile auf die Struktur der von Preston (s.o.) untersuchten Zellwände bekannt ist.

Zellwände von normal wachsenden (ZW) und von nicht wachsenden Zellen (ZW-DIP) geben Beugungsdiagramme, die im Bereich $d < 0.800$ nm relativ schmale, scharfe, mehr ring- als sichelförmige und keine punktförmigen Reflexe besitzen. Danach dürften in den Zellwänden nur kleine kristalline Bereiche relativ unregelmäßig zueinander orientiert vorliegen.

Verglichen mit dem relativ hoch orientierten Mannan I (M I) besitzen die übrigen in Tab. 4 aufgführten Proben eine geringere Anzahl Reflexe. Vom M I wurden in Tab. 4 nicht alle d-Werte wiedergegeben.

Die d-Werte der Zellwände (ZW u. ZW-DIP) im Bereich d<0.390 nm stimmen größtenteils mit den d-Werten des M I überein. Der Reflex bei d ≈ 1.040 nm liegt nur für ZW vor (dürfte aber für ZW-DIP nicht auszuschließen sein). Er entspricht sehr wahrscheinlich dem bei M I auftretenden Reflex d = 1.020 nm. Beide Reflexe dürften als'Mannanreflexe' (d= 1.030 nm; Marchessault u. Sarko, 1967) angesehen werden.

Im Falle der Zellwandkomponenten ZWF 1 und (dem isolierten Zellwandprotein) ZWK 1 treten im Bereich d < 0.390 nm Reflexe in geringerer Anzahl bzw. nicht auf. Da diese Zellwandkomponenten vornehmlich in ihrem Polysaccharidanteil verändert sein dürften (Reflexe bei d ≈ 1.030 nm wurden bisher auch nicht gefunden), kann angenommen werden, daß die Reflexe im Bereich d < 0.390 nm vorwiegend auf Polysaccharide zurückgehen.

Etwas anders verhält es sich mit der Mannankomponente MPR. Hier ist offensichtlich der Kristallinitätsgrad geringer, so daß nur wenig Reflexe im Bereich d < 0.390 nm auftreten. Wird eine aus einer hochkonzentrierten Lösung von MPR in Ameisensäure gewonnene Faser untersucht, so nimmt die Zahl der Reflexe in dem Bereich zu (ZWF 1^{x}). In ähnlicher Weise nimmt die Zahl der Reflexe im Beugungsdiamm der Komponente ZWF 1 zu, wenn diese Komponente nicht (vollständig) von der "weißflockigen" Komponente (s. auch: Abschnitt III/3.2.1.) befreit wird.

Diese Befunde und die d-Werte insbesondere von ZWK 1 und ZWF 1 im Bereich d > 0.390 nm lassen vermuten, daß einige der im Beugungsdiagramm der Zellwand auftretenden Reflexe durch Zellwandprotein bedingt sind. Es dürfte sich dabei vornehmlich um die Reflexe bei d = 0.780 nm, 0.633 nm und 0.404 nm (s. auch ZWF 2: d = 0.409 nm) handeln.
Sollte diese Annahme zutreffen, so könnte das Fehlen der entsprechenden Reflexe in Beugungsdiagrammen von Zellwänden DIP-behandelter Zellen auf Veränderungen im Zellwandprotein hinweisen.
Der neu auftretende Reflex d = 0.387 nm könnte ebenfalls mit Veränderungen in der Zellwandstruktur zusammenhängen.
Der Reflex d = 0.483 nm tritt erst nach Vorbehandlung der Zellwand durch Quellen in Ameisensäure auf. Er tritt auch z.B. in Beugungsdiagrammen von ZWK 1 auf und könnte mit strukturellen Veränderungen im Zellwandprotein in Verbindung gebracht werden.

Tab. 4
Netzebenenabstände, d (x 10^{-3} nm), aus Beugungsdiagrammen von Zellwänden wachsender Zellen (ZW), nicht wachsender Zellen (ZW-DIP), von Mannan I (M I)(Werte aus Tab. 9.1 aus Preston, 1974), von Zellwandkomponenten ZWF 1, ZWF 2, MPR, ZWK und ZWK 1 (s. Tab. 5). Zur Erläuterung der Zellwandkomponenten siehe Text und Tab. 3.
ZWK 1: isoliertes Zellwandprotein; MPR: Mannanpräzipitat;
ZWF 1: proteinreiche Zellwandkomponente (filmartig).
ZWF 1^{x}: Mannanfaser aus ameisensäurebehandeltem Mannan (MPR).
h: hydratisierte Probe (zum Vergleich u.a. mit ZWK 1).
$\bar{d}$: mittlerer d-Wert; Angabe bei Vorliegen eines breiten ringförmigen Reflexes. ---: keine Reflexe gefunden.

Zu Tab. 4: Die Zahlen in den Klammern () sind die Nr. der (vornehmlich) ausgewerteten Beugungsdiagramme.- Es wurden in der Regel die meridionalen Reflexe gemessen.

M I	ZW	ZW-DIP	ZWF2	ZWF2 h	ZWK	ZWK h	ZWF1 x	ZWF1	MPR		ZWK1 nach Tab. 5 h		h
1020	1040										1250	1270	1390
---	780	---	---	---	ā 727	ā 727	726	---	791	762	722	736	785
672	633	---	---	---	---	---	630	677	643	624	620	635	680
---	---	---	---	---	507	---	---	---	---	---	---	---	544
489	---	(483)*	477	---	---	483	---	477	494	494	485	480	---
---	---	---	---	---	---	462	460	---	---	---	---	---	---
445	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	421	---	---	---	---	---	---	---	437	---	---
---	---	---	---	417	417	---	---	---	---	---	---	420	---
414	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	404	---	ā 409	---	---	409	---	---	405	408	---	---	---
---	---	387	---	---	381	388	394	---	---	---	---	---	---
378	---	375	---	375	375	---	378	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
353	355	---	---	---	---	353	351	363	351	351	---	367	---
---	---	349	347	---	---	---	---	---	---	---	---	351	---
---	---	342	---	342	344	---	344	---	---	---	---	---	---
338	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	324	---	---	---	---	---	330	---	---	---	320	---	325
319	---	316	---	---	---	319	---	315	---	315	---	315	---
---	---	---	314	311	311	---	---	---	---	---	---	---	---
303	---	---	---	---	---	---	306	---	---	---	---	---	---
292	294	296	294	290	292	---	292	---	---	---	---	295	---
---	280	289	281	---	289	289	---	---	---	---	---	---	---
273	275	275	276	275	278	275	275	---	---	---	---	---	---
268	262		267	267		260	266	---	265	267			
---	252		248	247			251	255		---			
245	243		242				245			244			
237	236		239				---			232			
232	---		233				232			232			
229	229		226										
	(66, 70)	(87, 93)	(75, 76, 77)	(78)	(97)	(96)	(26, 2)	(1a-4a)	(1b-4b)				

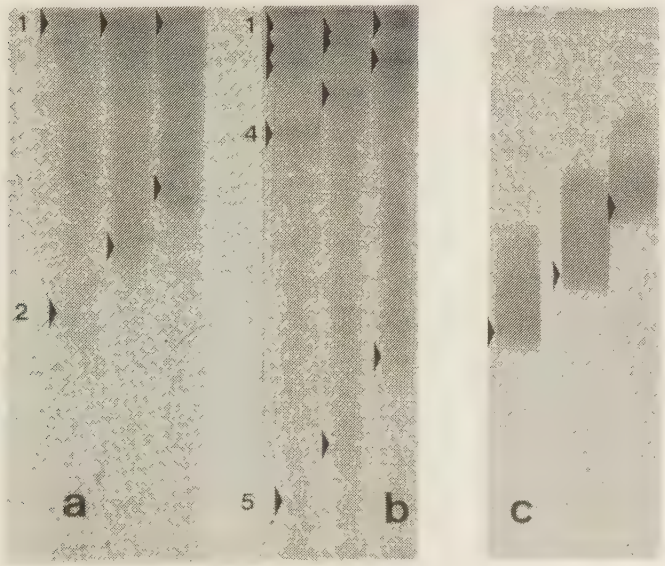
5. Charakterisierung des isolierten Zellwandproteins

5.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Zellwandproteinen und ihren Bromcyanpeptiden

Die Darstellung von Zellwandproteinen erfolgte aus Zellwand-Ameisensäure-Lösungen, die - um stärkere Degradation zu vermeiden - unterhalb 60° C hergestellt worden waren. Die dabei freigesetzten Proteine wurden nach dem Einengen der Lösungen in Elektrophoresepuffer, pH = 7, aufgenommen und durch Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt (Abb. 21 a). Neben einer hochmolekularen Komponente (1) mit noch unbestimmten Molekulargewicht (MG) resultierte eine niedrigmolekulare Komponente (2) mit einem MG zwischen 13000 und 14000.
Die Trennungen verliefen vermutlich wegen störender Begleitstoffe (Kohlehydrate) nicht immer zufriedenstellend. Allerdings ergaben hier nicht näher beschriebene gelelektrophoretische, gelchromatographische und röntgenographische Untersuchungen an weitgehend von Kohlehydraten befreiten Zellwandproteinen für die überwiegend vorliegende niedrigmolekulare Komponente auch ein MG von etwa 14000 bzw. 14200 und 14800 (Paradies et al., 1977 a, b).
Da die Zellwand nur in mehr als 60 % Ameisensäure gelöst bleibt, erschien mit Bromcyan, das in 70 % Ameisensäure Proteine an Methioninresten spaltet, eine weitere Untersuchung der schwer zugänglichen Zellwandproteine möglich. Die Auftrennung der Spaltprodukte (Abb. 21 c) ergab vier hochmolekulare Komponenten (1-4) und eine niedrigmolekulare Komponente (5). Von den hochmolekularen Komponenten bildet jene mit einem MG um 50000 eine relativ starke Bande (4). Die niedrigmolekulare Komponente, MG um 3000, bildet keine ausgeprägte Bande. Eine Komponente

mit dem MG 14000 wurde nicht gefunden.
Es dürften demnach sowohl die hoch- als auch die niedrigmolekulare Komponente (Abb. 21 a) gespalten worden sein. Die Ausbeute an Spaltprodukten war jedoch gering. Die Gründe dafür, die näheren Umstände der Spaltung, u.a. im Hinblick auf die 2 Methioninreste (Tab. 2), die eine geringere Anzahl von Spaltprodukten erwarten lassen, sind noch nicht klar.

Abb. 21 a-c
Gelelektrophoretische Trennung von ameisensäurelöslichen Zellwandproteinen (a), ihren Bromcyanpeptiden (b) sowie zum Vergleich (c) Cytochrom c (MG 12500). Von 1.n.r. 7.5 -, 8.5 - und 10 %ige Polyacrylamidgele. Färbung: Coomassie Blue. Ziffern an den Banden s. Text.



5.2. Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung des isolierten Zellwandproteins (ZWK 1)

Röntgenographische und spektroskopische Methoden ermöglichen die Ermittlung von Strukturdaten, ohne das Protein stark modifizieren zu müssen. Das ist insbesondere für das Zellwandprotein mit seinen komplizierten Löslichkeitseigenschaften von Bedeutung.

Die röntgenographische Untersuchung des Zellwandproteins (Molekulargewicht etwa 14000) wurde bei verschiedenen Hydratisierungsgraden vorgenommen (Abb. 22 a-d). Die ermittelten Netzebenenabstände (Tab. 5) von d = 0.54, 0.34, 0.27 nm sowie - nach Kippung der Faser um 30° zum Röntgenstrahl - von 0.15 nm sprechen für eine α-helikale Konformation (Pauling u. Corey, 1951). Die rechnerische Indizierung der d-Werte führt zu einem hexagonalen Gittertyp. Die Einheitszelle hat folgende Maße: a = 1.45 nm und c = 2.70 nm. (Zur Berechnung s. auch: Fraser u. MacRae, 1973; Krischner, 1974; Sherwood, 1976.) Die Breite des 0.15 nm-Reflexes zeigt eine ungefähre Länge der Helix von $\approx$ 3.0 nm an. Wird der Hydratisierungsgrad von 2 Mol auf 5 Mol Wasser pro Mol Aminosäurerest erhöht, so zeigt sich, daß sich die c-Achse nicht verändert, die a-Achse aber von 1.38 nm auf 1.5 nm zunimmt. Nach intensiver Trocknung der Probe bei 100° C ergibt sich ein Röntgendiagramm mit diffusen Reflexen. Rehydratisierung führt wieder zur Ausbildung scharfer Reflexe; der 1.27 nm-Reflex, der als Maß für den Abstand der Helices betrachtet wird, nimmt

in gequollenem Protein auf 1.39 nm zu (Tab. 5). Diese Daten, wie auch die relativ breit ausgeprägten Reflexe der oberen Schichtlinien werden dahingehend gedeutet, daß die Helixkonfiguration stabil bleibt, die Orientierung der aus mehreren Helices bestehenden Bereiche zueinander gering ist und bei Trocknung weiter abnimmt (Tab. 5).

Die Anzahl der Helices pro Einheitszelle (ihr Durchmesser beträgt ≈ 1.5 nm) ergibt sich aus der experimentell ermittelten Dichte von 1.23 $g \cdot cm^{-3}$ und der berechneten Dichte $d = n \cdot 1.20\ g \cdot cm^{-3}$ zu $n \approx 1$ Helix pro Einheitszelle.
Diese Ergebnisse wurden mit IR-spektroskopischen Messungen abgesichert (Tab. 6). Sie zeigen die für α-Helices typischen Amid I-Banden bei 1651 und 1656 cm^{-1}. Die für die ß-Struktur typische Bande bei 1630 cm^{-1} fehlt. (Zu Amid I-Banden s. auch: Miyazawa u. Blout, 1961; Elliot u. Ambrose, 1950.)
Die Amid I-Bande erweist sich als stabil und vom Hydratisierungsgrad der Probe unabhängig. Nach Trocknung der Probe ist nur eine Abnahme des Ordnungsgrades nicht aber der α-helikalen Konformation festzustellen.
Die α-helikale Konformation wird ebenfalls durch CD-Spektren bestätigt. Sie zeigen darüber hinaus, daß das Protein in 6 M Guanidiniumchlorid, pH = 5.5, als "random coil" vorliegt und nach Dialyse gegen Puffer, pH = 5.5, wieder in die α-helikale Konformation übergeht (Paradies et al., 1977 a).

Abb. 22 a-d

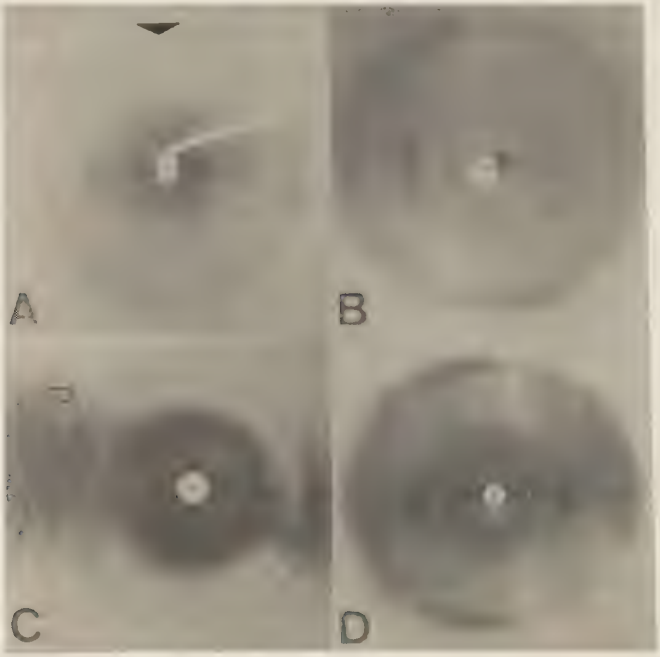
Beugungsdiagramme von orientierten Zellwandproteinpräparationen, die durch Präzipitation mit Hexafluorisopropanol gewonnen worden waren.

A: Bei 86.5 % relativer Feuchte; der Pfeil zeigt den für die α-helikale Konfiguration typischen 0.52 nm-Reflex.

B: Bei 75 % relativer Feuchte. C: Trockene Probe unter einem Winkel von 30° zum Röntgenstrahl; der Pfeil zeigt den für die α-helikale Konfiguration typischen 0.15 nm-Reflex.

D: Bei 70 % relativer Feuchte.

A, B, D: Aufnahmen auf Planfilm; C: Aufnahme auf zylindrisch angeordnetem Film.



Tab. 5

d-Werte und Intensitäten (I_o) der Reflexe aus Beugungsdiagrammen von Zellwandprotein. Die Proteinpräparationen wurden bei verschiedenen Hydratisierungsgraden untersucht (s. auch: Abb. 22 a-d)

Konzentrierte wässrige Lösung mit HFIP +	Trockene Probe (Film)	Probe (Faser) bei relativer Feuchte von 80 %		Hexagonales Gitter a = 1.45 nm c = 2.70 nm	
d (nm)	d (nm)	d (nm)	I_o	Index	d (nm) berechnet
1.390	1.250	1.270	vs	100	1.271
0.785	0.722	0.736	s	110	0.734
0.680	0.620	0.635	ms	200	0.640
0.544	0.485	0.480	mw	210	0.481
	0.437	0.420	w	300	0.424
		0.367	m	220	0.368
		0.351	w	310	0.352
	0.320	0.315	vw	400	0.318
		0.295	vw	320	0.292
Schichtlinien					
0.325 o.m.		0.540	m	005	0.540
o.m.	0.322	0.340	mw	008	0.340
m.		0.274	w	0010	0.274
m.	0.150	0.150	mw	0018	0.150

+HFIP = Hexafluorisopropanol, 20 % v/v

Intensitäten (I_o): vs: sehr stark, s: stark, ms: mittel stark, mw: mittel schwach;

Schichtlinien: o.m.: off-meridional; m.: meridional

Tab. 6

Amidbanden orientierter Filme von Zellwandprotein. Filme wurden aus ameisensaurer Zellwandlösung durch Präzipitation gewonnen, a: durch Verdünnen auf 10 %, b: durch Hexafluorisopropanol.

IR-Banden	(a)			(b)		
	cm^{-1}	I_o	Dichroismus	cm^{-1}	I_o	Dichroismus
Amid A	----			3273	vs	⊥
Amid I	3293	s	∥	----		
	1655	vs	∥	1656	s	∥
	1650	sh	⊥	1651	s	⊥
Amid II	1535	s	⊥	1528		⊥
	1520	w	∥	1515		∥
Amid III	1237	w	⊥	1320	w	⊥
Amid IV	612	m	⊥	720	m	⊥

Intensitäten (I_o): vs: sehr stark, s: stark, m: mittel, w: schwach; - sh: Schulter

IV. DISKUSSION

1. Zur Problemstellung und Methodik

Proteine waren bis vor einigen Jahren mehr als artifizielle denn als tatsächliche Bestandteile der Zellwand angesehen worden. Erst mit zunehmendem Interesse an molekularen Mechanismen des Wachstums, der Differenzierung und der Formbildung begann man, die Proteine der Zellwand zu untersuchen (Übersichten und frühere Literatur bei Lamport, 1965, 1970).

Die Schwierigkeiten bestanden zunächst in der Isolierung der Proteine, ihrer Abgrenzung von anderen Zell- und Zellwandbestandteilen und ihrer Klassifizierung. Es wurde insbesondere die Möglichkeit erörtert, daß die Zellwände, das Ausgangsmaterial für Proteinuntersuchungen, bei ihrer Isolation und Reinigung durch andere Zellwandbestandteile kontaminiert würden. Nach heutiger Kenntnis dürfte die durch Extraktion bewirkte Veränderung der Zellwandzusammensetzung in manchen Fällen schwerwiegender sein. So muß damit gerechnet werden, daß z.B. Natriumchloridlösungen je nach ihrer Stärke auch ionisch gebundene Zellwandanteile und nicht nur "Verunreinigungen" cytoplasmatischer Herkunft (z.B. Nukleoproteine) von der Zellwand entfernen. Die Veränderung der Zellwandzusammensetzung durch Extraktion kann jedoch durch entsprechend schonende Maßnahmen begrenzt werden.

Für die Zellwand von Polyphysa cliftonii kann wahrscheinlich gemacht werden, daß die Extraktion und auch die Kontamination nur einen geringen Einfluß auf die Zellwandzusammensetzung haben dürften (s. auch: Göke, 1972).

Nach Lamport (1965; 1970) sind ein Teil der Zellwandproteine als Strukturproteine kovalent an die relativ stabilen Strukturpolysaccharide gebunden, während ein anderer Teil leichter extrahierbar ist und daher wahrscheinlich zusammen mit Matrixpolysacchariden bzw. -oligosacchariden vorliegt. Eine solche Gliederung beruht vornehmlich auf Befunden, die mit Extraktionsverfahren erzielt wurden. Eine weitergehende Unterteilung der Proteine, z.B. nach funktionellen Gesichtspunkten, ist mit diesen Verfahren kaum oder nur schwer möglich. Angesichts der Komplexität der Zellwand bieten sie jedoch - entsprechend vorsichtig angewendet - eine erste Möglichkeit, Zellwandproteine einzelnen auch morphologisch zu charakterisierenden Zellwandkomponenten bzw. -bereichen zuzuordnen.

Da die Zellwand von Polyphysa in fibrilläre Komponenten und in Matrixkomponenten gegliedert werden kann, wurden diese als Basis für die Zuordnung der Zellwandproteine gewählt.
Bei den morphologischen Untersuchungen wirkte es sich erschwerend aus, daß die Zellwandproteine nur in ihrer Gesamtheit, als "Zellwandprotein", erfaßt werden konnten.
Die chemischen Befunde zur Gliederung des Zellwandproteins konnten nur begrenzt mit den morphologischen Befunden korreliert werden.

Als Nachteil erwies sich weiterhin, daß nur wenig über die Zellwandpolysaccharide (-oligosaccharide) von Polyphysa bekannt ist. Es können daher nur wenige Vorstellungen über die Beziehungen zwischen Zellwandproteinen und Zellwandpolysacchariden mitgeteilt werden.
Auf die bisher vorliegenden Befunde über die Polysaccharide der Zellwand soll hier kurz eingegangen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen frühere Befunde (Werz, 1963) und zeigen, daß die Zellwand von Polyphysa ähnlich wie die anderer Dasycladaceen aus Mannose, Galaktose, Rhamnose (und Glukose) besteht (Werz, 1963, 1964; Zetsche, 1967).

Mannose stellt den größten Anteil. Galaktose und Mannose liegen etwa im Verhältnis 1:2 vor. Analog zu anderen Dasycladaceen, die im Zellwandaufbau ultrastrukturelle (Mackie u. Preston, 1968) und chemische (Werz, 1963, 1964; Zetsche, 1967; Frei u. Preston, 1968) Ähnlichkeiten zeigen, könnten die fibrillären Strukturelemente der Polyphysa-Zellwand (Abb. 16 a-c) aus einem ß-1.4-Mannan aufgebaut sein. Die anderen Monosen - und bis zu einem gewissen Grad Mannose - könnten vorwiegend am Aufbau von Matrixsubstanzen beteiligt sein. Aufgrund des Phosphorgehalts der Zellwand wäre denkbar, daß sie ähnlich wie Hefe-Zellwände (Sentandreu u. Elorza, 1973) auch Phosphomannane enthält. Dieses, wie auch die Frage ob sulfatierte Polysaccharide (Perceival u. Smestad (1972) an Acetabularia crenulata) vorkommen sowie die Frage nach Art und Größe der Poly- und Oligosaccharide bedarf weiterer Untersuchungen.

2. Chemische Aspekte des Zellwandproteins und seiner Integration in die Zellwand

Nach den vorliegenden chemischen Befunden bilden Proteine neben den Polysacchariden die zweitgrößte Stoffklasse der Zellwand von Polyphysa. Sie machen ungefähr 1/3 des Trockengewichts der Zellwand aus. Die Zellwand nimmt damit etwa eine mittlere Stellung zwischen vorwiegend proteinhaltigen

Zellwänden (z.B. von Chlamydomonas; Hills, 1973) und vorwiegend polysaccharidhaltigen Zellwänden (z.B. von höheren Pflanzen; Lamport, 1970) ein. Das Verhältnis von Protein zu Polysaccharid beträgt bei Polyphysa etwa 1:2. Es entspricht damit z.B. etwa dem für alkalisch extrahierte Zellwandschuppen von Pleurochrysis gefundenen Verhältnis (Herth et al., 1972). Das Verhältnis von Protein zu Polysaccharid ist demnach nicht für alle Organismen konstant. Es variiert z.B. für die Zellwände von Hefen je nach dem Mannan-Typ von 1:1 bis 1:12 (ermittelt nach Daten aus Villanueva et al., 1973). Für Zellwände höherer Pflanzen beträgt es häufig 1:9. Auf mögliche Ursachen der Unterschiede soll später eingegangen werden.

Proteine und Polysaccharide liegen in der Zellwand von Polyphysa nach Hydrolysebefunden (Abschnitt III/2.1. sowie III/3.1.) und nach der Löslichkeit der Zellwand in Ameisensäure (Abschnitt III/3.2.) zu urteilen, sehr stabil gebunden vor (zur Stabilität der Zellwand s. auch Werz, 1963).
Auch mit starken Hydrolysemitteln können bei Raumtemperatur nur geringe Mengen an Aminosäuren und Monosen abgespalten werden. Ameisensäure löst die Zellwand bei Raumtemperatur unter Freisetzung geringer Mengen an Monosen und Aminosäuren; die Aggregationsfähigkeit von Zellwandkomponenten ist dabei nicht beeinträchtigt (Abschnitt III/3.2.1.). Das läßt darauf schließen, daß die Zellwandstruktur in bestimmten Bereichen vor allem durch Wasserstoffbrücken aufrechterhalten wird (Abschnitt III/3.2.).
Kovalente Bindungen zwischen Zellwandproteinen und -polysacchariden, u.a. insbesondere über Serin und Threonin, vermutlich

auch über Glutamin(säure) und Asparagin(säure), lassen seit kurzem vorliegende Hinweise vermuten (Göke, unveröffentlicht).

Die Existenz verschieden stabiler Bindungen zeigt sich auch an den unterschiedlichen Löslichkeiten der Zellwand in $ZnCl_2$-Lösung und in Ameisensäure. Sie korrespondieren vornehmlich mit den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der fibrillären Komponenten und der Matrixkomponenten der Zellwand.

Die Spektren von Zellwand-$ZnCl_2$-Lösungen (Abb. 15 a, b), von Zellwand-Ameisensäure-Lösungen (Abb. 18 a-c) und die gelelektrophoretischen Auftrennungen weisen darauf hin, daß in der Zellwand mindestens zwei Gruppen von Proteinen vorliegen. Nach gelelektrophoretischen Befunden dürfte es sich dabei um eine niedrig- und eine hochmolekulare Komponente handeln. Das Molekulargewicht der niedrigmolekularen Komponente liegt aufgrund verschiedener Bestimmungen sicher um 14000 (s. auch: Paradies et al., 1977 a, b). Kleinere Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Molekulargewichtsbestimmungen dürften auf methodische Einflüsse zurückgeführt werden können. Dafür, daß die niedrigmolekulare Komponente nicht erst bei der Isolierung von Protein aus der Zellwand entsteht spricht, daß sie nach gelelektrophoretischen Befunden den überwiegenden Anteil am isolierten Zellwandprotein bildet und daß die Aminosäurezusammensetzungen des gesamten Zellwandproteins (Tab. 2) und der niedrigmolekularen Komponente (Paradies et al., 1977 a) nur geringfügig voneinander abweichen. Diese Befunde lassen zugleich vermuten, daß die niedrigmolekulare Komponente den größten Anteil am Zellwandprotein ausmacht.

Für das Vorliegen einer hochmolekularen Komponente spricht,

daß auch nach Spaltung mit Bromcyan relativ hochmolekulare Komponenten im Spaltungsgemisch vorliegen.
Welche Beziehungen zwischen niedrig- und hochmolekularen Komponenten und zwischen ihnen und anderen Zellwandbestandteilen, z.B. den fibrillären Komponenten und den Matrixkomponenten bestehen, ist noch nicht bekannt. Einige Annahmen dazu lassen sich jedoch aus Befunden ableiten, die durch abgestufte Hydrolyse sowie beim Lösen der Zellwand gewonnen wurden. So zeigt sich, daß nach milder Disintegration der Zellwand in $ZnCl_2$-Lösung unter Erhaltung der fibrillären Komponenten Bestandteile freigesetzt werden, die offensichtlich keine oder wenig aromatische Aminosäuren enthalten (Abschnitt III/3.1.). Nach längerer, intensiver Hydrolyse werden dagegen aromatische Aminosäuren und die Aminosäuren Leucin, Serin, Asparagin- und Glutaminsäure - insbesondere bei höherer Temperatur - verstärkt freigesetzt. Die fibrilläre Komponente wird dabei zunehmend zerstört (zunehmende Freisetzung von Monosen) und die Aggregationsfähigkeit der gelösten Komponenten nimmt ab. Die letztgenannten Aminosäuren könnten daher vornehmlich aus Proteinen stammen, die eng mit den fibrillären Bestandteilen der Zellwand verbunden sind.

3. Strukturelle Aspekte des Zellwandproteins

Im Gegensatz zu zellulosehaltigen Zellwänden (Frey-Wyssling, 1976; Preston, 1974) zeigen die Zellwände von Polyphysa im röntgenographisch erfaßbaren molekularen Bereich einen relativ

niedrigen Ordnungsgrad. Sie ähneln damit den Zellwänden anderer Dasycladaceen (Preston, 1974).
Die vergleichenden Untersuchungen an Beugungsdiagrammen (Abschnitt III/4.; Tab. 4) lassen vermuten, daß das Protein in der Zellwand in röntgenographisch erfaßbaren Strukturen vorliegt, die offensichtlich bei Störungen der Zellwandbildung durch DIP Veränderungen erfahren.
Eine genaue Beschreibung der Strukturveränderungen wäre jedoch erst dann möglich, wenn die chemische Zusammensetzung der Zellwand besser geklärt wäre.

Im licht- und vor allem im elektronenmikroskopisch erfaßbaren Bereich weist die Zellwand von Polyphysa einen relativ hohen Ordnungsgrad auf. Er zeigt sich in ihrem schichtigen Aufbau und der vorwiegend fibrillären Organisation ihrer Schichten. Ähnlich wie Fibrillen in Zellwänden höherer Pflanzen weisen die fibrillären Strukturelemente bäumchenartige (bow-shaped; Roland et al., 1975; Peng u. Jaffe, 1976; Bouligand, 1972)[1] Verzweigungen auf (Abb. 2 a,c). Ob dies auf Ähnlichkeiten in der Zellwandbildung bei verschiedenen Organismen schließen läßt, muß noch offen bleiben.
Die fibrillären Strukturelemente dürften nach ihrem Kontrastierungsverhalten gegen PWS, pH = 2, vorwiegend aus Polysacchariden bestehen (Abb. 11 a). Ihre leichte Affinität zu PWS, pH = 8, könnte auf Proteine als Begleit- bzw. Hüllsubstanzen hinweisen (Abb. 6 b; 11 b). Daß Hüllsubstanzen vorhanden sind, zeigen auch z.B. Gefrierätzpräparate (Abb. 4 b). Ob solche Substanzen als Bestandteile von Fibrillen oder als Matrixbestandteile gedeutet werden müßten, ist noch nicht klar.

1) s. auch: Neville et al., 1976

Mit Rutheniumrot und PWS, pH = 8, konnten erste Hinweise auf (glyko-)proteinhaltige Strukturen ("konzentrische Strukturelemente") erhalten werden, die in der Zellwand mit den fibrillären Strukturelementen zusammen vorliegen.
An der Reaktion mit Rutheniumrot könnten die relativ sauren Zellwandproteine beteiligt sein. Nach Geyer (1973) kontrastiert Rutheniumrot Proteine, wenn sie einen relativ hohen Gehalt an Asparagin- und Glutaminsäure aufweisen. Andererseits ist eine Beteiligung saurer Polysaccharide an der Reaktion mit Rutheniumrot nicht auszuschließen. Darauf könnte auch die "Grundkontrastierung" der Zellwand hinweisen, die mit Rutheniumrot etwas stärker ausfällt als mit PWS, pH = 8.

Insgesamt korrespondiert das mit Rutheniumrot erhaltene Kontrastierungsmuster (stärker kontrastierte Zellwandzonen, Abb. 6 c; 12 a, b) mit der lichtmikroskopisch feststellbaren Färbung der Zellwand (Schichten, Abb. 5 a, b). Eine unterschiedliche Verteilung des Proteins in der Zellwand ist nach diesen Befunden wahrscheinlich. Unterschiedliche Verteilung von Zellwandprotein findet man auch in Zellwänden anderer Pflanzen (Cheung u. Barber, 1971; Colvin u.Leppard, 1971). Worauf eine solche Verteilung beruhen könnte (ob sie z.B. auf spezifischen Interaktionen zwischen Zellwandprotein(en) und Zellwandpoly- und-oligosacchariden beruht),kann zunächst nur hypothetisch erörtert werden (Abschnitt IV/7.) da noch zu wenige Untersuchungen vorliegen.

Die Einschlußkörper der Zellwand sind nach den Färbungsbefunden und den Kontrastierungen relativ proteinreiche Zellwandbestandteile. In normal wachsenden Zellen treten sie in geringer Zahl und relativ unregelmäßig im gesamten Zellwand-

wandbereich auf. Ihre Beziehung zum Zellwandwachstum bleibt vorerst unklar. Denkbar wäre, daß auf diese Weise eingegliedertes Material zum Dickenwachstum der Zelle (diese zeigt ja nicht nur Spitzenwachstum; Hämmerling u. Werz, 1958)beitragen könnte. Gegen eine solche Annahme spricht vorläufig, daß Einschlußkörper auch in Zellwänden "ausgewachsener" Zellen vorliegen. Weiterhin läßt das stark vermehrte Auftreten der Einschlußkörper in wachstumsgestörten Zellen (Abb. 7 a, b) eher vermuten, daß sie auch in normal wachsenden Zellen "lokale" Störungen der Zellwandbildung anzeigen.

Zellwandproteine treten in Zellwänden wachstumsgestörter (DIP-behandelter) Zellen in Verbindung mit strukturellen Veränderungen der Zellwand besonders hervor (Abschnitt III/1.2.3., Abb. 7 a, b; 8 a-d; 10 a, b; 11 a, b). Die Zellen, die durch Dunkelstellen, d.h. auf "natürliche Weise" , gehemmt wurden, zeigen nach bisherigen Befunden keine strukturellen Veränderungen. Danach dürften offensichtlich Beziehungen zwischen Zellwandprotein und dem Zellwandwachstum bestehen, die durch DIP gestört werden können.
Unklar bleibt, auf welche Weise der Fe-Chelator DIP (Tetley u. Thiman, 1975; Solomos, 1977) diese Beziehungen stört.
Das gilt insbesondere auch für die offensichtlich anhaltende Wirkung nach nur kurzfristiger Applikation des DIP.
Da das Zellwandprotein wenig bzw. kein Hydroxyprolin enthält (Tab. 2; s. auch: Göke, 1972, Paradies et al., 1977 a), kann eine Hemmung der Fe-abhängigen Hydroxylierung von Prolin mittelbar, aber weniger (bzw. nicht) unmittelbar als Störfaktor in Frage kommen.

Für die nach kurzfristiger Applikation von DIP verbleibende Wirkung dürfte eine Hemmung der Hydroxylierung von Prolin als Ursache ausscheiden, da es sich um eine reversible Hemmung handelt. Daher kann vorläufig geschlossen werden, das andere Mechanismen direkt oder indirekt durch DIP betroffen worden sein müssen, die auch nach Entzug von DIP die Störung wirksam vermitteln können.

Bei langfristiger Behandlung der Zellen mit DIP dürfte die Hemmung ihres Spitzenwachstums - wie vermutet (Abschnitt III/1.2.3.) - nicht (ausschließlich) auf eine Hemmung des Zellwandproteins zurückgehen. Es muß angenommen werden, daß DIP auch bei Polyphysa mit Prozessen der Photosynthese interferiert. Sollte sich Polyphysa dazu ähnlich wie andere Acetabularia-Arten (Gibor, 1977) verhalten, so dürfte eine Störung von Photosyntheseprozessen eine Störung bzw. Hemmung des Spitzenwachstums unmittelbar nach sich ziehen.
Eine Störung der Photosynthese dürfte über die Zellwandpoly-(oligo-)saccharidbiosynthese wirksam werden. Da nach Beendigung - insbesondere - der kurzfristigen Hemmung das Spitzenwachstum sofort wieder einsetzt und auch relativ "zügig" verläuft, und da nach entsprechender Zeit Wirtel, Hutkammern sowie Cysten gebildet werden, ist anzunehmen, daß die Fähigkeit, spezifische Zellwandpoly(oligo-)saccharide zu bilden nicht oder kaum beeinträchtigt ist. Die Störungen der Zellformbildung dürften daher vornehmlich mit den Zellwandproteinen in Verbindung gebracht werden. Die Aminosäurezusammensetzung der Zellwände DIP-behandelter Zellen (Goke, 1972) deutet auf eine veränderte Zusammensetzung der Zellwandproteine hin.

4. Zu den Zellwandkomponenten

Die Überlegungen zur Darstellung und Untersuchung von Zellwandkomponenten wurden in Abschnitt III/3. behandelt. Die Disintegration der Zellwand mit Ameisensäure und mit $ZnCl_2$-Lösung sollte zur Klärung der Beschaffenheit von Zellwandstrukturen beitragen.

Gegenüber spezifischeren, enzymatischen Aufschlußverfahren bietet die Anwendung dieser Lösungsmittel natürlich nur begrenzt Vorteile. Sie bestehen in der Gewinnung aggregationsfähiger sowie fibrilläre Strukturelemente enthaltender Zellwandkomponenten (ZWF und MPR; Tab. 3). Nachteile für die Charakterisierung der Zellwandkomponenten ergeben sich daraus, daß noch wenig über die physikochemischen Wirkungen der Lösungsmittel auf Zellwandbestandteile bekannt ist.

Das Mannanpräzipitat (MPR) und der Zellwandfilm (ZWF) wurden feinstrukturell im Vergleich mit der Zellwand betrachtet. Die in beiden Zellwandkomponenten auftretenden fibrillenartigen Strukturen (Abb. 16 a-c; 17; 20 a, b) entsprechen in ihrem Aufbau und ihrer Größe den fibrillären Strukturelementen der Zellwand. Der feinstrukturelle Vergleich der auf verschiedene Weise präparierten Objekte ist grundsätzlich nicht unproblematisch. Er dürfte hier jedoch innerhalb gewisser Grenzen zulässig sein, da beide Komponenten - insbesondere der Zellwandfilm - ohne größere chemische Umsetzungen, also relativ schonend aus dem gereinigten Zellwandmaterial gewonnen wurden. Für eine Erhaltung der fibrillären Bestandteile im Zellwandfilm (s. Gefrierätzpräparate) spricht auch, daß er aus relativ intakten Zellwandkomponenten gebildet wird. Die fibrillären Strukturen im Mannanpräzipitat dürften da-

gegen z.T. von Matrixbestandteilen befreit sein.
Am weitesten scheint die Disintegration bei den Zellwandkomponenten ZWF 1 und ZWF 2 gegangen zu sein. Die auftretenden helikalen Strukturen sind nicht direkt mit fibrillären Strukturelementen der Zellwand in Verbindung zu bringen. Wie sie zustandekommen kann noch nicht geklärt werden.

Problematisch bleiben Existenz und Beschaffenheit der "konzentrischen Strukturelemente" (Abschnitt III/1.). Sollten die Kontrastierungsbefunde distinkte Strukturen anzeigen, so könnten diese Strukturen möglicherweise auch in den Gefrierätzpräparaten der Zellwand und des Zellwandfilms erwartet werden. Die Befunde (Abb. 4 d; 20 a, b) scheinen dies zu bestätigen. Es muß jedoch hinzugefügt werden, daß trotz ähnlicher Befunde an verschiedenen Präparaten das Artefaktproblem nicht "ganz" ausgeräumt ist. Weitere Untersuchungen, die auch zur Beantwortung dieser Frage beigetragen hätten, waren aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

5. Zur Aggregation von Zellwandkomponenten

Auf die Existenz spezifischer Zellwandkomponenten, die "spontan" - auf nicht-enzymatischem Wege - zu Zellwand zusammentreten sollten, wurde in Abschnitt III/3.2.1. eingegangen.

Von den spontanen Mechanismen ist besonders gut das Self-Assembly "einfacher" Systeme untersucht, so z.B. die Organisation von Proteinen durch Faltung (Wetlaufer u. Ristow, 1973), die Organisation auch komplizierter Systeme wie Mikrotubuli, Flagellen, Viren und bereits sehr hoch organisierter Systeme wie Kollagenfibrillen (Bouck u. Brown, 1976).
Neuere Untersuchungen an Bakterienzellwänden (Thornley et al.,

1974; Beveridge u. Murray, 1976) und insbesondere an Zellwänden einiger einzelliger Algen, wie Chlamydomonas, zeigen (Hills, 1973; Roberts, 1974; Catt et al., 1976), daß auch diese komplexen Strukturen durch Self-Assembly rekonstituiert werden können.

Bei Polyphysa gelang erstmals der Nachweis, daß auch Zellwände, die über einen relativ hohen Polysaccharidgehalt verfügen und eine fibrilläre, schichtige Organisation zeigen, in Komponenten zerlegt werden können, die unter bestimmten Bedingungen aggregieren. Jedoch kann im Falle von Zellwänden dieser Art nur eine relativ einfache Struktur, nicht aber die komplexe Zellwandstruktur erwartet werden (s. auch: Roland et al., 1977).

Die Aggregation der Zellwandkomponenten von Polyphysa unterscheidet sich vom Self-Assembly anderer Systeme (z. B. Chlamydomonas-Zellwänden) dadurch, daß sie nicht bereits in der Lösung zu einer zellwandähnlichen Struktur führt sondern erst nach Entzug des Lösungsmittels.

Obwohl die Aggregation im einzelnen noch nicht untersucht ist, weisen die Befunde darauf hin, daß sie sehr wahrscheinlich auf der Wirkung eines Proteins beruht (Abschnitt III/3.2.1.). Es kann zusammen mit der Mannankomponente (MPR) gewonnen werden und bildet wahrscheinlich den größten Teil der daraus darstellbaren Zellwandkomponente ZWF 1.

Aufgrund der hohen Anteile von Asparagin- und Glutaminsäure kann vermutet werden, daß diese Aminosäuren nicht nur an Bindungen zwischen Protein und Polysaccharid (Abschnitt IV/2) beteiligt sind, sondern auch über freie Carboxylgruppen zur

Aggregation der Proteine beitragen. Ähnliches wird z.B. für Hefezellwände (Jayatissa u. Rose, 1976) und Bakterienzellwandproteine (Thornley et al., 1974) vermutet.

Über die Größe und Morphologie der aggregierfähigen Komponenten kann noch nicht viel gesagt werden. Die Streulichtmessungen (Abschnitt III/3.2.1.) lassen relativ große Komponenten vermuten. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich dabei bereits um Aggregate handelt. Nach den feinstrukturellen Untersuchungen an Zellwandfilmen müßte man vermuten, daß fibrilläre (und "konzentrische") Strukturelemente als (Bestandteile von) aggregierfähige(n) Komponenten in Frage kommen. Dies müßte jedoch noch weiter überprüft werden.

6. Zum isolierten Zellwandprotein

Die biochemischen und röntgenstrukturanalytischen Befunde am isolierten Zellwandprotein zeigen, daß es Eigenschaften eines Strukturproteins besitzt. In seiner Aminosäurezusammensetzung (Paradies et al., 1977 a) zeigt es wenig Ähnlichkeit mit Zellwandproteinen höherer Pflanzen (Lamport, 1965). Ähnlichkeit besteht zu Proteinen der Chlamydomonas-Zellwand (Roberts, 1974), der Zellwände bei Physarum (Henney u. Chu, 1977), bei Microsporum (Page u. Stock, 1974), bei Acinetobacter (Thornley et al., 1974) und erstaunlicherweise zu Paramyosin (Walton u. Blackwell, 1973). Mit einigen dieser Proteine hat das Zellwandprotein hydrophobe Eigenschaften gemeinsam.
Die Untersuchungen am isolierten Protein, das vorwiegend die Komponente vom Molekulargewicht 14000 enthält, zeigen, daß es eine unter verschiedenen Bedingungen sehr stabile α-helikale Konformation besitzt. Die Helices liegen im isolierten Zell-

wandprotein zu mehreren, parallel angeordnet, in Bündeln vor. Diese sind unregelmäßig zueinander orientiert.
Wegen der fehlenden Kenntnisse über die Primärstruktur ist noch offen, warum sich unter den Versuchsbedingungen die hohen Glycin-, Glutamin- und Asparaginsäureanteile nicht störend auf die α-Konformation auswirken.
Daß auch eine ß-Konformation möglich sein müßte, lassen die ringförmigen 0.4 nm-Reflexe im Beugungsdiagramm der proteinreichen Zellwandkomponente ZWF 2 vermuten (Tab. 4). Hinweise auf eine Umlagerung von der α- in die ß-Konformation ergaben sich auch aus neueren unveröffentlichten Untersuchungen von Paradies u. Werz.

Ob das Zellwandprotein beim "Ausgliedern" aus der Zelle seine Konformation ändert und in welcher Konformation es in der intakten Zellwand vorliegt, bedarf weiterer Untersuchungen.

7. Modellvorstellungen zur Protein-Polysaccharid-Interaktion bei der Zellwandbildung

Anhand der bisher von Polyphysa-Zellwandproteinen und von anderen Objekten vorliegenden Daten wurden Modellvorstellungen zur Protein-Polysaccharid-Interaktion bei der Zellwandbildung entwickelt. Sie müssen folgendes erklären:
a) Parallele und transversale Orientierung der Fibrillen in der Zellwand und ihre Beziehungen zu anderen Zellwandbestandteilen,
b) Lösbarkeit der Zellwand in Ameisensäure unter Erhaltung der Strukturelemente,

c) Verteilung der Proteinkomponente(n) in der Zellwand.

Es wird postuliert, daß Zellwandpolysaccharide und -oligosaccharide nach dem für Glykoproteine geltenden Prinzip kovalent mit Proteinen verbunden sind (z.B. Ballou, 1974; Brown u. Kimmins, 1977; Franz, 1975; Sentandreu u. Elorza, 1973). Das heißt, an einem Proteinmolekül würden an definierten Stellen Poly- und Oligosaccharide gebunden sein.
Der Aufbau der Zellwandglykoproteine würde über die Polysaccharidbiosynthese und über die genetisch determinierte Zusammensetzung der Proteine geregelt werden.

Die Bildung von Glykoproteinen vollzieht sich nach heutiger Kenntnis an Zellmembranen (Lit. bei Spiro, 1973, Chrispeels, 1976, Waechter u. Lennarz, 1976).
Die Bildung der Zellwandpoly- und -oligosaccharide vollzieht sich nach heutiger Kenntnis ebenfalls an Zellmembranen. So wird vermutet, daß sich Zellwandpolysaccharide im Bereich des Plasmalemmas "bilden" und fibrillär organisieren (Roland, 1973; Brown u. Montezinos, 1976; Brown et al., 1976; Chrispeels, 1976; Kiermayer, 1977; Robenek u. Peveling, 1977). (Daß z.B. der Golgi-Apparat von Pleurochrysis komplexe Polysaccharidstrukturen aufbauen kann, steht dazu nicht im Widerspruch.)

Da die fibrillär organisierten Zellwandpolysaccharide terminal an ein Proteinmolekül gebunden sein würden, könnte zusammen mit der Fibrille ein Teil des Proteins nach "außen" verlagert werden, während der andere Teil des Proteins, der hydrophob sein müßte (ähnlich wie bei Membranglykoproteinen von roten Blutkörperchen etc.), noch in der Membran verankert

bliebe.

Die Orientierung der Fibrillen würde nach Maßgabe der elektrochemischen und sterischen Verhältnisse vorwiegend parallel zur Membran erfolgen (s. auch: Mühlethaler, 1967; Thiele, 1967).Die zur Membran "abbiegenden" Proteinmoleküle könnten miteinander und mit umliegenden Poly- und Oligosacchariden über Wasserstoffbrücken vernetzen. Gleichzeitig müßte eine (geringe) Verlagerung der in der Membran lokalisierten "Syntheseorte" (mit den noch daran gebundenen Proteinen) relativ zu den bereits in den Zellwandbereich eingegliederten Fibrillen stattfinden. So könnte neben der parallelen eine ± transversale Textur (bow-shaped; Roland et al., 1977) der Zellwand zustandekommen.

Eine Stabilisierung der Protein-Poly(Oligo-)saccharidstrukturen der Zellwand würde nach dem bisher Gesagten zum großen Teil auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beruhen. Das würde auch die Löslichkeit der Polyphysa-Zellwand in Ameisensäure erklären.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zellwandproteine von Polyphysa - ihre Hydrophobizität, ihre Tendenz zur Aggregation, ihre Flexibilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke (Paradies et al., 1977 b) könnten für die Mitwirkung "spontaner" Mechanismen bei der Zellwandbildung die Grundlage sein.

Die unterschiedliche Proteinverteilung in der Zellwand könnte damit erklärt werden, daß im Verlaufe der Zellwandbildung Glykoproteine in die Zellwand eingebaut werden, die sich erheblich in ihren Poly- bzw. Oligosaccharidanteilen unterscheiden.

Mögliche Glykoproteine in der Zellwand von Polyphysa könnten ähnlich wie bisher untersuchte Hefezellwand-Glykoproteine (z.B. Ballou, 1974) aufgebaut sein. Hochmolekulare Mannane - im Falle von Polyphysa wahrscheinlich ß-1.4-Mannane - würden über N-Acetylglucosaminreste an Asparaginreste, Oligosaccharide dagegen an Serin- (oder Threonin-)reste des Proteins gebunden sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden an der einzelligen, marinen Grünalge Polyphysa (Acetabularia) cliftonii die Zellwandproteine der Stielzellwände untersucht. Dabei interessierten ihre Integration in die Zellwand, ihre molekulare Struktur und ihr Verhalten im Hinblick auf das Zellwandwachstum.

1. Die Zellwände von Polyphysa enthalten etwa 30 % Protein. Das Verhältnis von Protein zu Polysaccharid beträgt etwa 1:2. Das Protein ist in der Zellwand ungleichmäßig verteilt. Die Zellwandinnenschichten sind relativ proteinreich.
Das Zellwandprotein steht wahrscheinlich in enger Beziehung zum Zellwandwachstum und zur Formbildung. Insbesondere letztere scheint - nach Untersuchungen an 2.2'-Dipyridyl-behandelten Zellen - vornehmlich von Störungen des Zellwandproteinstoffwechsels betroffen zu werden.

2. Die feinstrukturelle Untersuchung der Zellwand erbrachte Hinweise auf die Existenz (glyko-)proteinreicher, distinkter Strukturelemente. Diese Befunde wurden im Zusammenhang mit chemischen Daten diskutiert.

3. Die Zellwand konnte mit Ameisensäure und $ZnCl_2$-Lösung in Komponenten zerlegt werden, wodurch z.T. eine Zuordnung von Zellwandproteinen zu Zellwandstrukturen möglich wurde.
Durch Behandlung mit Ameisensäure konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß auch eine polysaccharidreiche, komplex gebaute Zellwand in aggregierfähige Komponenten zerlegt werden kann. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Aggregation auf eine vorwiegend proteinhaltige Komponente zurück-

geht.

4. Die Zellwand enthält eine niedrigmolekulare und mindestens eine hochmolekulare Proteinkomponente.

Die niedrigmolekulare Komponente, die nach röntgenographischen Messungen ein Molekulargewicht von etwa 14000 besitzt, scheint nach gelelektrophoretischen Befunden den größten Anteil des Proteins auszumachen.

Die röntgenographische und spektroskopische Untersuchung dieser Komponente zeigte, daß das Protein eine stabile α-helikale Konformation besitzt. Die Helices liegen im isolierten Protein zu mehreren, parallel angeordnet, in Bündeln vor. Die Bündel sind unregelmäßig zueinander orientiert.

Die berechnete Elementarzelle ist hexagonal und hat die Abmessungen a = 1.45 nm, c = 2.7 nm und einen Durchmesser von 1.5 nm; sie umfaßt eine Helix.

Stabile Konformation, Hydrophobizität, Aggregationsfähigkeit und andere Eigenschaften kennzeichnen das Protein als Strukturprotein.

5. Es wurden Vorstellungen zur Protein-Polysaccharid-Interaktion bei der Zellwandbildung dargelegt.

VI. PUBLIKATIONEN

Göke, L., H.H. Paradies und G. Werz
Cell wall polypeptides of Polyphysa (Acetabularia) cliftonii: Amino acid composition of stalk and cap cell wall polypeptides.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 22 - 27 (1974)

Göke, L.
Zellwandprotein bei Acetabularia.
Vortrag / DFG-Tagung: Biochemie der Morphogenese.
Heidelberg, 23. - 24. 2. 1977

Paradies, H.H., L. Göke und G. Werz
On the spatial structure of a plant cell wall protein. Secondary structure of a cell wall protein from Acetabularia.
Protoplasma 93, 249 - 265 (1977)

Paradies, H.H., L. Göke und G. Werz
Flexibility of a cell wall protein from Acetabularia.
In: Progress in Acetabularia research. (Ed.: C.L.F. Woodcock)
Academic Press, New York, 305 - 315 (1977)

VII. LITERATUR

Albersheim, P., W.D. Bauer, K. Keestra, K.W. Talmadge
The structure of the wall of suspension-cultured sycamore cells.
In: Biogenesis of plant cell wall polysaccharides. (Ed.: F. Loewus)
Academic Press, New York, 117 - 147 (1973)

Ballou, Cl.E.
Some aspects of the structure, immunochemistry, and genetic control of yeast mannans.
Adv. Enzymol. 40, 239 - 270 (1974)

Beveridge, T.J. and R.G.E. Murray
Reassembly in vitro of the superficial cell wall components of Spirillum putridiconchylium.
J. Ultrastruct. Res. 55, 105 - 118 (1976)

Bouck, B. and D.L. Brown
Self-assembly in development.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 71 - 94 (1976)

Bouligand, Y.
Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases.
Tissue & Cell 4, 189 - 217 (1972)

Bourne, E.J., E. Perceival and B. Smestad
Carbohydrates of Acetabularia species.
Part I. A. crenulata.
Carbohydrate Res. 22, 75 - 82 (1972)

Brown jr., R.M. and D. Montezinos
Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 73, 143 - 147 (1976)

Brown, R.G. and W.C. Kimmins
Glycoproteins.
Int. Rev. Biochem. 13, 183 - 209 (1977)

Brown jr., R.M., J.H.M. Willison and C.L. Richardson
Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: Visualisation of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 73, 4565 - 4569 (1976)

Cleghorn, R.A. and L. Jendrassik
Biochem. Z. 274, 189 (1934)

Catt, J.W., G.J. Hills and K. Roberts
A structural glycoprotein, containing hydroxyproline, isolated from the cell wall of Chlamydomonas reinhardii.
Planta 131, 165 - 171 (1976)

Chrispeels, M.J.
Biosynthesis, intracellular transport, and secretion of extracellular macromolecules.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 19 - 38 (1976)

Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner
Microdetermination of phosphorus.
Anal. Chem. 28, 1756 - 1758 (1956)

Cheung, D.S.M. and H.N. Barber
Uredospore wall proteins of wheat stem rust. Localization and enzymatic activities.
Arch. Mikrobiol. 77, 239 - 246 (1971)

Colvin, J.R. and G.G. Leppard
The non-uniform distribution of proteins in plant cell walls.
J. Microscopie 11, 285 - 298 (1971)

Drawert, H. und M. Mix
Zur Frage von Struktur und Funktion des "Golgi-Apparates" in Pflanzenzellen.
Sitz.-Ber. Ges. Beförd. ges. Naturwissensch. Marburg 83/84, 361 - 382 (1961/62)

Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Reber and F. Smith
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem. 28, 350 - 356 (1956)

Elliot, A. and E.J. Ambrose
Structure of synthetic polypeptides.
Nature 165, 921 - 922 (1950)

Engels, F.M.
Function of golgi vesicles in relation to cell wall synthesis in germinating Petunia pollen.
IV. Identification of cellulose in pollen tube walls and golgi vesicles by x-ray diffraction.
Acta Bot. Neerl. 23, 209 - 215 (1974)

Franz, G.
Abstract of the 8th cellulose conference.
Cellulose Res. Inst., Suny,
Syracuse, New York (1975)

Fraser, R.D.B. and T.P. MacRae
Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides.
Academic Press, New York (1973)

Frei, E. and R.D. Preston
Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls.
III. Mannan in siphoneous green algae.
Proc. Roy. Soc. B 169, 127 - 145 (1968)

Frey-Wyssling, A.
The plant cell wall.
Hdb. Pflanzenanatomie III/4
Bornträger, Berlin (1976)

Freundlich, A. and A.W. Robards
Cytochemistry of differentiating plant vascular cell walls with special reference to cellulose.
Cytobiologie 8, 355 - 370 (1974)

Gabara, B.
Characterization of fibrous Compound of golgi vesicles in tapetal cells of Delphinium.
Protoplasma 86, 159 - 168 (1975)

Geyer, G.
Ultrahistochemie.
Fischer, Stuttgart (1973)

Gibor, A.
The role of the cell-apex in elongation of Acetabularia.
Protoplasma 93, 101 - 107 (1977)

Göke, L.
Zellwandpolypeptide: Verhalten bei der Morphogenese pflanzlicher Zellen und Mechanismus ihrer Bildung.
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie (23) der Freien Universität, Berlin (1972)

Göke, L., H.H. Paradies and G. Werz
Cell wall polypeptides of Polyphysa (Acetabularia) cliftonii: Amino acid composition of stalk and cap cell wall polypeptides.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 22 - 27 (1974)

Green, P.B.
Cell morphogenesis.
Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 364 - 394 (1969)

Gross, E.
The cyanogen bromide reaction.
In: Methods in Enzymol. (Ed.: S.P. Colowick and N.O. Kaplan), Vol. XI, 238 - 255 (1967)

Hämmerling, J.
Zur Lebensweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen.
Arch. Protistenkunde 97, 7 - 56, 1944

Hämmerling, J. und G. Werz
Über den Wuchsmodus von Acetabularia.
Z. Naturforschg. 13 b, 449 -454 (1958)

Henry, N.F.M., Lipson, H. and Wooster, W.A.
The interpretation of x-ray diffraction photographs.
Mcmillan, London (1961)

Hedrick, J.L. and A.J. Smith
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 126, 155 - 164 (1968)

Henney, H.R. and Ph. Chu
Chemical analysis of cell walls from microcysts and microsclerotia of Physarum flaviconum. Comparison to slime coat from microplasmodia.
Exptl. Mycol. 1, 83 - 91 (1977)

Heath, J.B.
An unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis.
J. Theor. Biol. 48, 445 - 449 (1974)

Herth, W., W.W. Franke, J. Stadler, H. Bittiger, G. Keilich and R.M. Brown jr.
Further characterization of the alkali-stable material from the scales of Pleurochrysis scherffelii: A cellulosic glycoprotein.
Planta 105, 79 - 92 (1972)

Hills, G.J.
Cell wall assembly in vitro from Chlamydomonas reinhardi.
Planta 115, 17 -23 (1973)

Jayatissa, P.M. and A.H. Rose
Role of phosphomannan in flocculation of Saccharomyces cerevisiae.
J. Gen. Microbiol. 96, 165 - 174 (1976)

Jirginsons, B. and M.E. Straumanis
A short textbook of colloid chemistry.
Pergamon Press, London (1954)

Jotterand-Dolivo, M.C. and P.E. Pilet
Wall hydroxyproline and growth of georeactive roots (Zea mays L.).
Experientia 32, 874 - 875 (1976)

Kameya, T.
The effects of gelatin on aggregation of protoplasts from higher plants.
Planta 115, 77 - 82 (1973)

Kiermayer, O.
Biomembranen als Träger morphogenetischer Information. Untersuchungen bei der Grünalge Micrasterias.
Naturw. Rdsch. 30, 161 - 169 (1977)

Kochhar, D.M., M.B. Aydelotte and T.K. Vest
Altered collagen fibrillogenesis in embryonic mouse limb cartilage deficient in matrix granules.
Exptl. Cell Res. 102, 213 - 222 (1976)

Krischner, H.
Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse.
Vieweg, Braunschweig (1974)

Küster, E.
Die Pflanzenzelle.
Fischer, Jena (1956), 3. Aufl.

Lamport, D.T.A.
The protein component of the primary cell walls.
Adv. Bot. Res. II, 151 - 218 (1965)

Lamport, D.T.A.
Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin.
Nature 216, 1322 - 1324 (1967)

Lamport, D.T.A.
Cell wall metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 235 - 270 (1970)

Leppard, G.G. and J.R. Colvin
The fine structure of the middle lamella of aggregates of plant cells in suspension culture.
J. Cell Biol. 50, 237 - 246 (1971)

Loewus, F. (Ed.)
Biogenesis of plant cell wall polysaccharides.
Academic Press, New York (1973)

Luft, J.H.
Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purifications, methods of use, and mechanism of action.
Private Veröffentlichung (1966); s.a.: Geyer (1973)

Mackie, W. and R.D. Preston
The occurence of mannan microfibrils in the green algae Codium fragile and Acetabularia crenulata.
Planta 79, 249 - 253 (1968)

Marchessault, P.H. and A. Sarko
X-ray structure of polsaccharides.
Adv. Carbohydr. Chem. 22, 421 - 482 (1967)

Meier, H.
On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates.
Biochim. Biophys. Acta 28, 229 - 240 (1958)

Miyazawa, T. and R.E. Blout
The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands.
J. Amer. Chem. Soc. 83, 712 - 719 (1961)

Miwa, T., Y. Iriki and T. Suzuki
Mannan and xylan as essential cell wall constituents of some siphoneous green algae. In: Chimie et physicochimie des principes immédiates tirés des algues. (Ed.: M.R. Heim)
Coll. int. du centre nat. de la rech. scient. 103, 135 - 144 (1961)

Moore, S. and W.H. Stein
Ninhydrin method. In: Methods in enzymol. (Ed.: S.P. Colowick and N.O. Kaplan), Vol. III
Academic Press, New York, 468 - 471 (1957)

Mühlethaler, K.
Ultrastructure and formation of cell walls.
Ann. Rev. Plant Physiol. 18, 1 - 24 (1967)

Nečas, O.
Physical conditions as important factors for the regeneration of naked yeast protoplasts.
Nature 192, 580 (1961)

Nečas, O., A. Svoboda and M. Kopecká
The effect of cycloheximide (actidione) on cell wall synthesis in yeast protoplasts.
Exptl. Cell Res. 53, 291 - 293 (1968)

Neville, A.C., D.C. Gubb and R.M. Crawford
A new model for cellulose architecture in some plant cell walls.
Protoplasma 90, 307 - 317 (1976)

Page, W.J. and J.J. Stock
Changes in Microsporum gypseum mycelial wall and spore coat glycoproteins during sporulation and spore formation.
J. Bacteriol. 119, 44 - 49 (1974)

Paradies, H.H., L. Göke and G. Werz
On the spatial structure of a plant cell wall protein. Secondary structure of a cell wall protein from Acetabularia.
Protoplasma 93, 249 - 265 (1977 a)

Paradies, H.H., L. Göke and G. Werz
Flexibility of a cell wall protein from Acetabularia.
In: Progress in Acetabularia research. (Ed.: C.L.F. Woodcock)
Academic Press, New York, 305 - 315 (1977 b)

Pauling, L. and R.B. Corey
The structure of hair, muscle, and related proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. 37, 261 - 271 (1951)

Peng, H.B. and L.F. Jaffe
Cell-wall formation in Pelvetia embryos. A freeze-fracture study.
Planta 133, 57 - 71 (1976)

Perceival, E. and B. Smestad
Carbohydrates of Acetabularia species. Part II. A. crenulata acid polysaccharide.
Carbohydrate Res. 25, 299 - 312 (1972)

Preston, R.D.
Structural and mechanical aspects of plant cell walls with particular reference to synthesis and growth.
In: The formation of wood in forest trees. (Ed.: M.H. Zimmermann)
Academic Press, New York, 169 - 188 (1964)

Preston, R.D.
The physical biology of plant cell walls.
Chapman and Hall, London (1974)

Ray, P.M., W.R. Eisinger and D.G. Robinson
Organelles involved in cell wall polysaccharide formation and transport in pea cells.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 121 - 146 (1976)

Reddi, K.K.
Ultraviolet absorption studies on tobacco mosaic virus.
Biochim. Biophys. Acta 24, 238 - 241 (1957)

Reynolds, E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208 - 213 (1963)

Robenek, H. and E. Peveling
Ultrastructure of wall regeneration of isolated protoplasts of Skimnia japonica Thunb..
Planta 136, 135 - 145 (1977)

Roberts, K.
Crystalline glycoprotein cell walls of algae: Their structure, composition and assembly.
In: The electron microscopy and composition of biological membranes and envelopes. (Ed.: R. Markham)
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 268 B, 129 - 146 (1974)

Robinson, D.G. and R.D. Preston
Plasmalemma structure in relation to microfibril biosynthesis in Oocystis.
Planta 104, 234 - 246 (1972)

Robinson, D.G., W.R. Eisinger and P.M. Ray
Dynamics of the golgi system in wall matrix polysaccharide synthesis and secretion by pea cells.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 147 - 161 (1976)

Roelofsen, P.A. and A.L. Houwink
Architecture and growth of the primary wall in some plant hairs and in the Phycomyces sporangiophor.
Acta bot. Neerl. 2, 218 - 225 (1953)

Roland, J.C. et B. Vian
Réactivité du plasmalemme végétal. Etude cytochimique.
Protoplasma 73, 121 - 137 (1971)

Roland, J.C.
The relationship between the plasmalemma and the plant cell wall.
Int. Rev. Cytol. 36, 45 - 92 (1973)

Roland, J.C., B. Vian and D. Reis
Observations with cytochemistry and ultracryotomy on the fine structure of the expanding walls in actively elongating plant cells.
J. Cell Sci. 19, 239 - 259 (1975)

Roland, J.C., B. Vian and D. Reis
Further observations on cell wall morphogenesis and polysaccharide arrangement during plant growth.
Protoplasma 91, 125 - 141 (1977)

Sentandreu, R. and M.V. Elorza
The biosynthetic pathway of yeast mannan glycoproteins.
In: Yeast, mould and plant protoplasts. (Eds.: J.R. Villanueva, I. García-Acha, S. Gascón and F. Uruburu)
Academic Press, London, 187 - 204 (1973)

Shapiro, A.L., Vinuela, E. and J.V. Maizel
Molecular weight estimation of polypeptide-chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 - 820 (1967)

Sherwood, D.
Crystals, x-rays and proteins.
Longman, London (1976)

Shore, G., Y. Raymond and G.A. Machlachlan
The site of cellulose synthesis. Cell surface and intracellular ß-1.4-glucan(cellulose) synthetase activities in relation to the stage and direction of cell growth.
Plant Physiol. 56, 34 - 38 (1975)

Singer, S.J.
The properties of proteins in nonaqueous solvents.
Adv. Protein Chem. 17, 1 - 68 (1962)

Solomos, T.
Cyanide-resistant respiration in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 279 - 297 (1977)

Spackman, H., S.D. Moore and W.H. Stein
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Anal. Chem. 30, 1190 - 1206 (1958)

Spiro, R.G.
Glycoproteins.
Adv. Protein Chem. 27, 349 - 467 (1973)

Spurr, A.R.
A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. 26, 31 - 43 (1969)

Tetley, R.M. and K.V. Thimann
The metabolism of oat leaves during senescence. IV. The effects of α,α'-dipyridyl and other metal chelators on senescence.
Plant Physiol. 56, 140 - 142 (1975)

Thiele, H.
Histolyse und Histogenese.
Gewebe und ionotrope Gele. Prinzip einer Strukturbildung.
Akadem. Verlagsges., Frankfurt a.M. (1967)

Thornley, M.J., K.J. Thorne and A.M. Glauert
Detachment and chemical characterization of the regularly arranged subunits from the surface of an Acinetobacter.
J. Bacteriol. 118, 654 - 662 (1974)

Villanueva, J.R., I. García-Acha, S. Gascón and F. Uruburu (eds.)
Yeast, mould and plant protoplasts.
Academic Press, London (1973)

Waechter, C.J. and W.J. Lennarz
The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis.
Ann. Rev. Biochem. 45, 95 - 112 (1976)

Walton, A.G. and J. Blackwell
Biopolymers.
Academic Press, New York (1973)

Weidel, W. and H. Pelzer
Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls.
Adv. Enzymol. 26, 193 - 232 (1964)

Wetlaufer, D.B. and S. Ristow
Acquisition of three-dimensional structure of proteins.
Ann. Rev. Biochem. 42, 135 - 158 (1973)

Werz, G.
Membranbildung bei kernlosen wachsenden und nicht wachsenden Teilen von Acetabularia mediterranea.
Z. Naturforschg. 12 b, 739 - 740 (1957)

Werz, G.
Vergleichende Zellmembrananalysen bei verschiedenen Dasycladaceen.
Planta 60, 322 - 330 (1963)

Werz, G.
Unterschiede in der Zusammensetzung von Mannanen aus verschiedenen Dasycladaceen-Arten.
Planta 60, 540 - 542 (1964)

Werz, G.
Determination and Realization of Morphogenesis in Acetabularia.
BrookHaven Symp. in Biol. 18, 185 - 203 (1965)

Werz, G.
Morphologische Veränderungen in Chloroplasten und Mitochondrien von verdunkelten Acetabularia-Zellen.
Planta 69, 53 - 57 (1966)

Werz, G.
Induktion von Zellwandbildung durch Fremdprotein bei Acetabularia.
Naturwissenschaften 54, 274 (1967)

Werz, G.
Cytoplasmic control of cell wall formation in Acetabularia.
In: Current topics in microbiology and immunology. Vol. 51,
Springer, Berlin, 27 - 62 (1970 a)

Werz, G.
Mechanisms in cell wall formation in Acetabularia.
In: Biology of Acetabularia. (Eds.: Brachet, J. and S. Bonotto)
Academic Press, New York, 125 - 144 (1970 b)

Werz, G.
Fine-structural aspects of morphogenesis in Acetabularia.
Int. Rev. Cytol. 38, 319 - 367 (1974)

Wetlaufer, D.B.
Ultraviolet spectra of proteins and amino acids.
Adv. Protein Chem. 17, 303 - 390 (1962)

Whelan, W.J.
On the origin of primer for glycogen synthesis.
Trends in biochem. Sci. 1, 13 - 15 (1976)

Willison, J.H.M.
An examination of the relationship between freeze-fractured plasmalemma and cell wall microfibrils.
Protoplasma 88, 187 - 200 (1976)

Wright, K. and D.H. Northcote
Identification of ß-1-4-glucan chains as part of a fraction of slime synthesized within the dictyosomes of maize root caps.
Protoplasma 88, 225 - 239 (1976)

Zerban, H., M. Wehner und G.Werz
Über die Feinstruktur des Zellkerns von Acetabularia nach Gefrierätzung.
Planta 114, 239 - 250 (1973)

Zetsche, K.
Unterschiedliche Zusammensetzung von Stiel- und Hutzellwand bei Acetabularia mediterranea.
Planta 76, 326 - 334 (1967)

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Werz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. H. Paradies danke ich für sein Interesse und seine Unterstützung, die mir den Zugang zur Röntgenstrukturanalyse und wichtige Ergebnisse ermöglichten.

Dem Wohlwollen von Frau Prof. Dr. Ruth Ficke, Technische Universität Berlin, habe ich es zu verdanken, daß ich als ihr Assistent meine Dissertation bei Herrn Prof. Dr. G. Werz durchführen konnte.

Frau Helga Zuther und Herrn Michael Wehner danke ich für technische Unterstützung bei einigen elektronenmikroskopischen Arbeiten und der Gefrierätzung.

LEBENSLAUF

Name:	Lüder Göke
Geburtsdatum:	2.12.46
Eltern:	Fritz Göke und Henriette Göke, geb. Wesche
Geburtsort:	Nordenham
1953 - 1966:	Schulausbildung; Abitur (1966) am Gymnasium Nordenham
1966 - 1972:	Studium an der Freien Universität Berlin: Medizin (1966 - 1968); Biologie (1968 - 1972).
1972:	Abschluß des Diploms in Biologie am Fachbereich Biologie (23) der Freien Universität Berlin. Die Diplomarbeit fertigte ich bei Prof. Dr. G. Werz an. Ihr Thema: Zellwandpolypeptide: Verhalten bei der Morphogenese pflanzlicher Zellen und Mechanismus ihrer Bildung.
1969 - 1972:	Studentische Hilfskraft am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität.
1973 - 1977:	Wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung Botanik des Max-Volmer-Institutes der Technischen Universität Berlin bei Prof. Dr. Ruth Eicke.
1973 - 1977:	Anfertigung der Dissertation bei Prof. Dr. G. Werz und Prof. Dr. Dr. H. H. Paradies, Fachbereich Biologie (23) der Freien Universität Berlin.

Ich bin seit 1969 mit Ursel Göke, geb. Vowinkel, verheiratet und habe ein Kind.